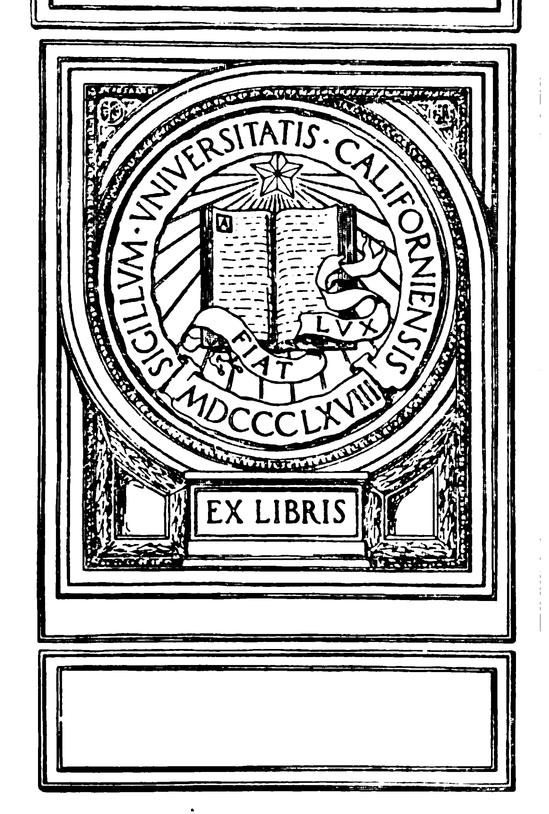
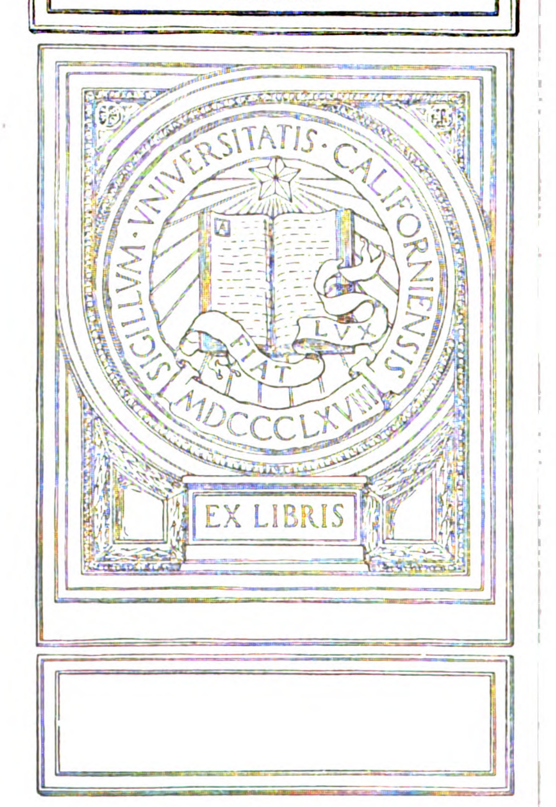



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS




SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS









Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

161

Hunderteinundsechzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Studien über parenterale Resorption.

III. Mitteilung:

Versuche der Beeinflussung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau.

Von

N. Okuneff.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 3. Mai 1925.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In meinen früheren Experimenten[1]) habe ich die Resorption des kolloidalen Farbstoffs Trypanblau aus der Bauchhöhle beim Kaninchen unter normalen Bedingungen studiert. Nun erschien mir auch interessant, nachzuprüfen, inwiefern die Resorption des genannten Farbstoffs auf verschiedenen Wegen gehemmt oder gefördert werden kann. In der vorliegenden Arbeit führe ich Versuchsresultate an, wie der osmotische Druck und die H-Ionenkonzentration der eingeführten Farbstofflösung den Farbengehalt des Blutes in verschiedenen Zeitperioden nach der Injektion beeinflussen. Ferner wurde von mir in derselben Richtung die Wirkung einiger Stoffe nachgeprüft, die als resorptionsverzögernde Mittel gelten oder zur Therapie der Peritonitis gebraucht werden (Adrenalin, Olivenöl, Campheröl, Äthyläther).

Hara[2]) hat unlängst gezeigt, daß die Erhöhung des osmotischen Druckes der eingeführten Lösung die intraperitoneale Resorption des Farbstoffs Fluorescein bedeutend beeinträchtigt. Was die Reaktion der eingeführten Lösung betrifft, so ist *M. Fischer*[3]) bekanntlich der Meinung, daß Säuren und Alkalien die intraperitoneale Resorption von Wasser und Salzen stark verzögern. Jedoch folgt aus den bekannten Untersuchungen von *Bethe*[4]), *Rohde*[5]) und *Pohle*[6]), daß für Farbstoffe die Verhältnisse etwas anders

---

[1]) *Okuneff*, diese Zeitschr. **147** u. **149**, 103 u. 534, 1924.
[2]) *Hara*, ebendaselbst **126**, 281, 1921 bis 1922.
[3]) *M. Fischer*, Kolloidchemische Beihefte **2**, 304, 1911.
[4]) *Bethe*, diese Zeitschr. **127**, 1922.
[5]) *Rohde*, Pflügers Arch. **168**, 1917; **182**, 1920.
[6]) *Pohle*, Ref. Deutsch. med. Wochenschr. **48**, 1921.

liegen: saure Farbstoffe werden nämlich im sauren Medium gut resorbiert, im alkalischen schlecht. Für basische Farbstoffe gelten umgekehrte Verhältnisse. Die Verzögerung der intraperitonealen Resorption nach Adrenalineinführung [*Exner*[1]), *Freytag*[2]), *Fleischer, Moyer* und *Loeb*[3]) u. v. a.] wird nach *Hara* (l. c.) auch bei Farbstoffinjektionen beobachtet. *Nakashima*[4]) konnte nachweisen, daß auch die intraperitoneale Resorption kolloidaler Stoffe durch Adrenalineinführung in die Bauchhöhle beeinträchtigt wird. Den Nachweis der Verzögerung der Resorption aus der Bauchhöhle nach Olivenölinjektionen verdanken wir *Glimm*[5]); die resorptionshemmenden Eigenschaften des Campheröls hat *Hirschel*[6]) besonders eingehend studiert. *Danielsen*[7]) zeigte, daß Olivenöl auch die Resorption von Suspensionen (Bakterien) verzögert. Der Gebrauch des Äthers bei Peritonitis [*Championniere*[8]), *Wolfsohn*[9]), *Vogt*[10]), *Seifert*[11]), *Caccini*[12]) u. v. a]. begründet sich eher auf den desinfizierenden als auf den resorptionsverzögernden Eigenschaften des Stoffes.

Eigene Untersuchungen.

Methodik.

In allen Fällen wurden von mir parallele Versuche unter normalen und abnormen Bedingungen an einem und demselben Tiere angestellt. Als Versuche unter normalen Bedingungen bezeichne ich solche, in welchen die 1proz. Trypanblaulösung in isotonischer Locke-Ringerlösung in die Bauchhöhle eingespritzt wurde. Um die Zuverlässigkeit solcher parallelen Versuche an einem und demselben Tiere nachzuprüfen, wurden spezielle Kontrollversuche angestellt, in welchen Kaninchen isotonische Farbstofflösungen in die Bauchhöhle wiederholt eingeführt wurden. Letztgenannte Versuche zeigten (s. Kurve, Abb. 1), daß nach wiederholten intraperitonealen Injektionen derselben Farbstoffmengen ceteris paribus fast der gleiche Farbstoffgehalt im Blute in den entsprechenden Zeitperioden beobachtet wird.

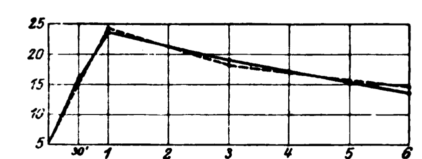


Abb. 1. Auf der Abszisse sind die Stunden abgetragen, auf der Ordinate der Prozentgehalt an Farbe im Gesamtblut, bezogen auf die injizierte Farbenmenge. Punktierte Kurve: Menge von Trypanblau im Blut nach der ersten Injektion, ausgezogene Kurve gleich nach der zweiten Injektion (10 Tage nach der ersten).

Nur muß dabei zwischen den einzelnen Farbstoffinjektionen eine Zeitperiode von mindestens 7, besser 10 Tagen verflossen sein, damit die

---

[1]) *Exner*, Zeitschr. f. Heilk. **24**, 1903.
[2]) *Freytag*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **55**, 1906.
[3]) *Fleischer, Moyer* und *Loeb*, The Journ. of exper. Med. **12**, 1910.
[4]) *Nakashima*, Pflügers Arch. **158**, 1914.
[5]) *Glimm*, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. **83**, 1906.
[6]) *Hirschel*, Bruns Beitr. **56**, 1907.
[7]) *Danielsen*, ebendaselbst **54**, 1907.
[8]) *Championniere*, Journ. de med. et de chir. **10**, 369, 1913.
[9]) *Wolfsohn*, Münch. med. Wochenschr. **49**, 1918.
[10]) *Vogt*, Mitteil. aus d. Grenzgeb. d. Med. u. Chirurgie **31**, 1919.
[11]) *Seifert*, Münch. med. Wochenschr. **4**, 129, 1919.
[12]) *Caccini*, Ref. Zentr. f. Chirurgie **11**, 593, 1924.

Farbenspuren von der vorherigen Injektion völlig aus dem Blute verschwinden. Die Methodik der Einführung der Farbstofflösung, der Blutentnahmen und -untersuchungen war dieselbe wie in meinen früheren Arbeiten. Blutuntersuchungen wurden 30 Minuten, 1, 3 und 6 Stunden nach der Injektion ausgeführt. Um dem Verständnis des Mechanismus der Resorption der Farbe etwas näher zu kommen, wurden von mir einige Diffusionsversuche mit Trypanblaulösungen in Gelatine und Agar-Agar angestellt. Dabei bediente ich mich der *Liesegang*schen[1]) Methodik. Gutgewaschene 2proz. Gelatine und 2proz. Agar-Agar wurden bis zum isoelektrischen Punkte gebracht (Kontrolle der H-Ionenkonzentration mittels der Indikatorenreihe nach *Michaelis*), mehrere Tage im fließenden Wasser gewaschen und die Länge der in feste Gelatine bzw. Agar-Agar eingedrungenen Farbensäule gemessen. In diesen Versuchen wurde der Einfluß der Konzentration, des osmotischen Druckes und der Reaktion der Farbenlösung, ferner die Wirkung der Beimengung von Adrenalin, Olivenöl, Campheröl und Äther nachgeprüft.

1. Einfluß des osmotischen Druckes der Farbstofflösung in der Bauchhöhle auf den Farbengehalt des Blutes.

Am neunten Tage nach dem Kontrollversuch (Resorption aus der Bauchhöhle unter normalen Bedingungen) führte ich denselben Kaninchen in die Bauchhöhle die gleichen Farbstoffmengen ein, die in einigen Versuchen in destilliertem Wasser, in anderen in hypertonischer (mit dreifachem Salzgehalt, $\Delta = -2{,}0$) Locke-Ringerlösung gelöst waren.

Wie aus den unten angeführten Kurven (Abb. 2) leicht zu ersehen ist, trat in den Versuchen mit der Einführung von Trypanblau in hypertonischer Lösung ($\Delta = -2{,}0$) eine deutliche Verzögerung der Re-

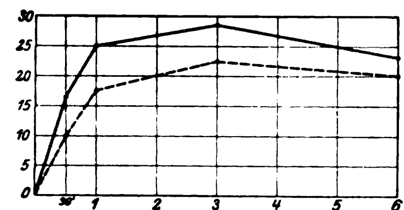


Abb. 2. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe in die Bauchhöhle in isotonischer Locke-Ringerlösung. Punktierte Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe in hypertonischer Locke-Ringerlösung. Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

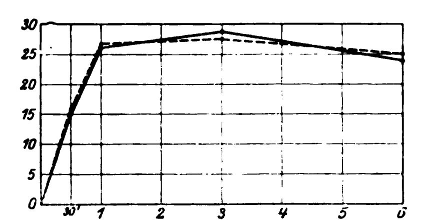


Abb. 3. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe in die Bauchhöhle in isotonischer Locke-Ringerlösung. Punktierte Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe im destillierten Wasser. Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

sorption des Farbstoffs ein, und zwar war der Farbengehalt des Blutes stets niedriger als in den Versuchen mit der Einführung von Trypanblau in isotonischer Lösung ($\Delta = -0{,}68$). Dagegen konnte ich in den Versuchen mit Einführung von Trypanblau in destilliertem Wasser

[1]) *Liesegang*, Die Diffusion in Gallerte. Abderhaldens biol. Arbeitsmethoden 1924.

($\Delta = 0$) keinen angeblichen Unterschied von der Norm konstatieren (Kurve Abb. 3).

Bei Diffusion von Trypanblau in Gallerte (feste Gelatine) fand ich nach 24 Stunden bei Anwendung von 1 Proz. Trypanblau in 2proz. NaCl-Lösung ($\Delta = -1{,}2$) die Länge der Farbensäule in Gelatine $= 7{,}8$ cm, bei Trypanblau in 0,75proz. NaCl-Lösung ($\Delta = -0{,}53$) $= 9{,}5$ cm, bei Trypanblau in 0,25proz. NaCl-Lösung ($\Delta = -0{,}16$) $= 10$ cm, bei Trypanblau in destilliertem Wasser ($\Delta = 0$) $= 12$ cm[1]. Die Diffusion der Farbe in feste Gelatine geschieht also mit steigendem osmotischen Drucke der Farbstofflösung immer schlechter.

Diese Erscheinung, sowie die schlechtere Resorption von Trypanblau aus hypertonischer Salzlösung als aus iso- und hypotonischer, kann vielleicht dadurch erklärt werden, daß Trypanblau in Anwesenheit von Salzen zum Teil ausgeflockt wird [*Schulemann*[2])]. Solche Erscheinungen der Ausflockung beobachtete auch ich in meinen Versuchen sowohl in vitro als auch in vivo. In der Bauchhöhle der Kaninchen, die nach der Injektion von Trypanblau in hypertonischen Salzlösungen seziert wurden, fand ich beständig reichliche Massen ausgeflockter Farbe, was beim Gebrauch isotonischer Lösungen niemals der Fall war.

2. *Einfluß der Reaktion der Farbstofflösung.*

Am achten Tage nach dem Kontrollversuch (Einführung in die Bauchhöhle des Farbstoffs Trypanblau in destilliertem Wasser gelöst) wurden denselben Versuchstieren genau dieselben Farbstoffmengen in n/50 HCl und in n/50 NaOH-Lösungen eingeführt[3]).

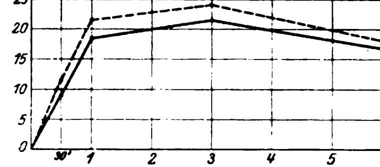


Abb. 4. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe in die Bauchhöhle im destillierten Wasser. Punktierte Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe in 1/50 n HCl-Lösung. Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Wie aus der unten angeführten Abbildung leicht zu ersehen ist, verursacht die Beimengung von Säuren eine *Beschleunigung* der Resorption (Abb. 4). In demselben Sinne wirkt auch die Beimengung von Alkali, aber bei weitem nicht so stark. Diese Beschleunigung der Resorption äußert sich darin, daß der Farbengehalt des Blutes in Versuchen mit Injektion von Trypan-

---

[1]) Die Säule der eingedrungenen Farbe besteht aus zwei Teilen: einem blauen, scharf abgegrenzten, und einem roten, mehr diffusen. Der rote Teil liegt unter dem blauen, was dadurch zu erklären ist, daß die rote Komponente des Trypanblau bekanntlich diffusibler ist als der blaue (*Möllendorff*, Anatom. Hefte **53**, 87, 1915 bis 1916).

[2]) *Schulemann*, diese Zeitschr. **80**, 1917.

[3]) Diese Konzentration der Säuren und Alkalien verursacht nach *M. Fischer* (l. c.) die maximale Verzögerung der Resorption.

blau + Säure oder Alkali in allen Zeitperioden größer ist als in der Norm.

Die Versuche mit der Diffusion von Trypanblau in Agar-Agar[1]) zeigten, daß sowohl H- als auch OH-Ionen die Diffusion der Farbe in feste Gallerte *beeinträchtigen*. Am deutlichsten tritt diese Erscheinung bei Säurewirkung zutage. So fand ich für die Lösung der Farbe im destillierten Wasser die Länge der Farbensäule im Gallert = 9 bis 10 cm, für die Lösung der Farbe in n/50 HCl = 5 bis 6 cm, für die Lösung der Farbe in n/50 NaOH = 7 bis 8 cm. Somit besteht zwischen Beeinflussung der Resorption durch Säure und Alkali und der Diffusion in Gallerte durch dieselben Substanzen gegebenenfalls kein Parallelismus[2]).

3. Einfluß des Adrenalins auf die intraperitoneale Resorption von Trypanblau.

Kaninchen, denen 9 Tage vordem Trypanblau in isotonischer Locke-Ringerlösung eingeführt wurde, spritzte ich genau dieselben Farbenmengen ein, wobei 10 Minuten vor der Injektion 1 ccm Adrenalinlösung (1 : 1000) injiziert wurde.

Wie aus der unten angeführten Kurve (Abb. 5) zu ersehen ist, rufen Adrenalininjektionen eine deutliche Verzögerung der Farben-

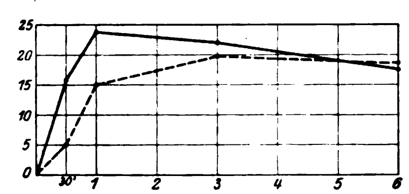


Abb. 5. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe unter normalen Bedingungen. Punktierte Kurve-Menge der Farbe im Blute bei gleichzeitiger Adrenalininjektion (s. Text). Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

resorption aus der Bauchhöhle nach sich. Die Wirkung des Adrenalins auf die Resorption von Trypanblau ist keine langdauernde, wie es auch zu erwarten war.

---

[1]) Für Diffusionsversuche mit Verwendung von Säuren und Alkalien ist Agar-Agar vorzuziehen, da Gelatine dabei oft verflüssigt wird.

[2]) Nach den Anschauungen von *Bethe* und *Rohde* (l. c.) müßte der Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Diffusion von Trypanblau sich anders gestalten (vgl. oben S. 1). Möglicherweise erklärt sich die von mir beobachtete identische Wirkung von Säure und Alkali auf Trypanblau dadurch, daß dieser Farbstoff, der allgemein als negativ geladenes Kolloid gilt, freien Säuren und Alkalien gegenüber amphotere Eigenschaften äußert. So fand ich für p_H (mit Hilfe der Gaskettenmethode gemessen) bei n/50 HCl = 1,67, dagegen bei n/50 HCl + Trypanblau: p_H = 2,3, p_H bei n/50 NaOH beträgt = 11,69, bei n/50 NaOH + Trypanblau = 10,38.

Auf die Diffusion von Trypanblau in Gelatine wirken Beimengungen von Adrenalin (1 : 1000) verlangsamend[1]. Da aber das von mir benutzte Adrenalinpräparat (*Parke & Davis*) beträchtliche Mengen von NaCl enthält, so ist diese Wirkung von Adrenalin wahrscheinlich auf den Einfluß des NaCl selbst zurückzuführen.

Die Wirkung von Adrenalin auf die Resorption von Trypanblau aus der Bauchhöhle steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit den durch Adrenalin hervorgerufenen Anämie-Erscheinungen [vgl. *Klapp*[2])].

4. *Einfluß des Oliven- und Campheröls auf die intraperitoneale Resorption von Trypanblau.*

Olivenöl wurde in der Menge von 4 bis 5 ccm, Ol. camphorat (10proz.) in der Menge von 0,5 bis 1 ccm 10 bis 15 Minuten vor der Injektion der Farbe eingeführt. Allen Versuchstieren (sechs) wurde zur Kontrolle 7 bis 8 Tage vor der Injektion dieselbe Farbenmenge in isotonischer Salzlösung injiziert.

Aus den von mir angestellten Versuchen erwies es sich, daß die Olivenölinjektionen ohne merklichen Einfluß auf die Resorption von Trypanblau aus der Bauchhöhle sind. Anders mit Campheröl; dieser letztere Stoff ruft eine deutliche Beschleunigung der Farbenresorption aus der Bauchhöhle, die sich darin äußert, daß der Farbengehalt des Blutes abnorm hoch ist (s. Kurve Abb. 6).

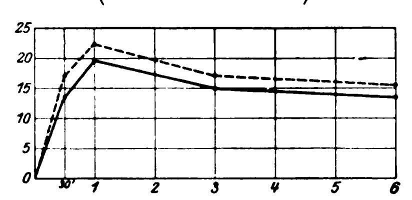


Abb. 6. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe unter normalen Bedingungen. Punktierte Kurve-Menge der Farbe im Blute bei gleichzeitiger Campherölinjektion (s. Text). Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

Die von *Glimm*, *Hirschel*, *Danielsen*[3]) u. a. angenommenen resorptionsverzögernden Eigenschaften des Oliven- und des Campheröls konnte ich somit für Trypanblau nicht nachweisen. Im Gegenteil fand ich, daß Campheröl die Resorption von Trypanblau sogar beschleunigt. Diese letztere Wirkung des Campheröls könnte vielleicht durch die reizende Wirkung dieser Substanz verursacht werden; haben doch *Klapp* und *Freytag* (l. c.) gezeigt, daß eine durch Reizung des Bauchfells erzeugte Hyperämie der Bauchorgane die intraperitoneale Resorption begünstigt.

---

[1]) Länge der Farbensäule in Gelatine statt 11 cm 9,5 cm.
[2]) *Klapp*, Mitteil. a. d. Grenzgebieten d. Med. u. Chirurgie **10**, **1902**.
[3]) l. c.

Die Diffusion von Trypanblau in feste Gallerte wird durch die Beimengung zu der Farbstofflösung von Oliven- und Campheröl in keiner Weise beeinflußt, was auch a priori zu erwarten war (Trypanblau ist bekanntlich lipoidunlöslich).

5. Einfluß von Äther auf die intraperitoneale Resorption von Trypanblau.

Äthyläther wurde in zwei Versuchen 3 bis 4 Sekunden vor, in zwei anderen Versuchen gleich nach der Injektion der Farbstofflösung in der Menge von ½ bis 2 ccm eingeführt. Allen Versuchstieren wurde zur Kontrolle 9 Tage vordem dieselbe Farbenmenge in isotonischer Salzlösung injiziert und die Farbstoffmenge im Blute mehrmals bestimmt.

Wie aus der unten angeführten Kurve (Abb. 7) zu ersehen ist, tritt nach Ätherinjektionen eine deutliche Verzögerung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau ein.

Auf die Besprechung des Mechanismus dieser Verzögerung möchte ich an dieser Stelle nicht eingehen. Es sei nur bemerkt, daß in meinen Versuchen nach Ätherinjektionen starke Transsudationserscheinungen

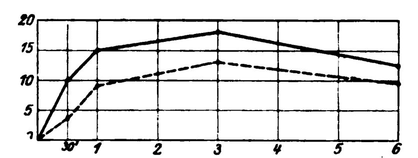


Abb. 7. Ausgezogene Kurve-Menge von Trypanblau im Blute nach der Injektion der Farbe unter normalen Bedingungen. Punktierte Kurve-Menge der Farbe im Blute nach gleichzeitiger Ätherinjektion (s. Text). Übrige Bezeichnungen wie bei Kurve Abb. 1.

in der Bauchhöhle beobachtet wurden. Möglicherweise steht diese Erscheinung in irgend einem Zusammenhang mit der oben erwähnten Resorptionsverzögerung.

Auf die Diffusion von Trypanblau aus der Wasserlösung in die feste Gallerte bleibt die Ätherbeimengung ohne jeglichen Einfluß.

Zusammenfassung.

Die oben angeführten Versuche zeigen, daß der Farbengehalt des Blutes nach der Injektion von Trypanblau in die Bauchhöhle durch verschiedene der Farbstofflösung zugesetzte Substanzen beeinflußt werden kann. Die große Farbstoffkonzentration[1]) und der hohe osmotische Druck der Farbstofflösung beeinträchtigen die Resorption der Farbe, sofern letztere sich im Gehalte der Farbe im Blute abspiegelt. Die saure sowie die alkalische Reaktion der Farbstofflösung wirken im entgegengesetzten Sinne. Aus den bekannten resorptionshemmenden

[1]) Siehe Mitteilung I, diese Zeitschr. **147**, 103, 1924.

Stoffen bewirken Adrenalin und Äther eine Verzögerung der Resorption, Olivenöl bleibt ohne Einfluß und Campheröl hat sogar eine Beschleunigung der Resorption zur Folge. Bei der Erklärung des Mechanismus dieser Beeinflussung der intraperitonealen Resorption von Trypanblau ist zu berücksichtigen, daß die Beeinflussung der Resorption auf zwei Wegen geschehen kann. Einerseits können die Eigenschaften der zu resorbierenden Substanz selbst geändert werden, so daß sie in kleineren Mengen in die Blutbahn übertritt. Solche Möglichkeit können wir vorwiegend für die Wirkung des hohen osmotischen Druckes auf die Resorption von Trypanblau annehmen, da unter dem Einfluß der Elektrolyten eine Ausflockung von Trypanblau eintritt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß nicht die Substanz, die resorbiert wird, sondern vorwiegend der Resorptionsapparat selbst, d. h. das lebendige Kolloidsystem des Peritoneums beeinflußt wird. Eine solche Beeinflussung der parenteralen Resorption ist für die Wirkung von Adrenalin, Campheröl und Äther anzunehmen.

Schlußfolgerungen.

1. Die starke Konzentration und die Erhöhung des osmotischen Drucks der Trypanblaulösung verzögern die Resorption dieses Farbstoffs aus der Bauchhöhle.

2. Durch Änderung der H-Ionenkonzentration der Farbstofflösung wird ihre Resorption aus der Bauchhöhle beschleunigt.

3. Die Diffusion von Trypanblau in feste Gallerte wird durch die Beimengung zu der Farbstofflösung von Salz, Säure und Alkali beeinträchtigt.

4. Adrenalin und Äther verzögern die Resorption von Trypanblau aus der Bauchhöhle, das Campheröl beschleunigt sie, das Olivenöl bleibt in dieser Beziehung ohne Wirkung.

5. Die Beeinflussung der Resorption von Trypanblau aus der Bauchhöhle geschieht auf zwei Weisen: 1. durch die Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farbstofflösung, 2. durch die Wirkung auf den Resorptionsapparat (Peritoneum) selbst.

Quantitative Enzymbestimmungen an Mikroorganismen. I.
Der Katalasegehalt der Bakterien.

Von

Artturi I. Virtanen und **H. Karström.**

[Aus dem Laboratorium der Butterexportgesellschaft Valio m. b. H. Helsinki (Finnland).]

(Eingegangen am 25. März 1925.)

I. Einleitung.

Für den Vergleich der mannigfaltigen, durch Bakterien verursachten Reaktionen gibt es zurzeit noch keine quantitativen Zahlen. In der Literatur wird die Fähigkeit von verschiedenen Bakterien, Fette, Wasserstoffsuperoxyd usw. zu zersetzen, mit den Ausdrücken: schwach, bedeutend, stark spaltend bezeichnet. Das Wachstum der Bakterien und die Wirksamkeit der Zelle an spaltenden Enzymen, die zwei vollständig verschiedene Vorgänge sind, werden in solchen Ausdrücken vereinigt.

In dem Bestreben, die Enzymwirksamkeit bei den Bakterien quantitativ zu bestimmen und vergleichbare Zahlen zu erhalten, hat der eine von uns[1]) schon früher die Gärungsfähigkeit der Milchsäurebakterien untersucht und sie durch den Quotienten:

$$Gv \text{ (Gärungsvermögen)} = \frac{k\,.\,\text{g Zucker}}{\text{Zellenzahl}}$$

ausgedrückt. Die Enzymwirksamkeit wird in diesem Falle pro Zelle berechnet, wie das früher von *v. Euler* und Mitarbeitern bei der Bestimmung des Enzymgehalts der Hefe vorgeschlagen worden ist.

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Katalasegehalt der Bakterien quantitativ zu bestimmen versucht. Als Ausdruck der

---

[1]) *Virtanen*, H. **184**, 300, 1924.

katalatischen Fähigkeit der Bakterien (Kat. f.) ist der Quotient aus der Reaktionskonstante der Wasserstoffsuperoxydspaltung k und der angewandten Enzymmenge, als Zellenzahl ausgedrückt, angewandt worden.

$$\text{Kat. f.} = \frac{\text{Reaktionskonstante } k}{\text{Zellenzahl}}.$$

Dieser Quotient scheint den Katalasegehalt der verschiedenen Bakterien sehr gut zu charakterisieren. Bei den Bakterien ist nach unseren Bestimmungen die ganze Katalasemenge in lebenden Zellen reaktionsfähig, und die Katalasewirkung wird durch äußere Bedingungen wie durch Trocknen, Protoplasmagifte und Erwärmung, nicht erhöht. Bei der Hefe liegen die Verhältnisse nach der sehr interessanten Arbeit von *Euler* und *Blix*[1]) ganz anders.

Die prinzipielle Frage, welche von den beiden Methoden: die Enzymwirksamkeit pro Zelle oder pro Gewichtseinheit auszudrücken, die besten Resultate gibt, ist schwer zu entscheiden. Unsere Versuche haben jedoch wahrscheinlich gemacht, daß der Katalasegehalt der Bakterien unabhängig von der Größe der Zellen ist. Es scheint daher, daß unsere Methode, die Katalasewirksamkeit pro Zelle zu berechnen, das genaueste Bild von dem Katalasegehalt der Bakterien gibt.

Die Eigenschaft fast aller lebenden Materie, sowohl animalischer als vegetabilischer Herkunft, das Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und Sauerstoff zu zerlegen, ist schon längst bekannt. Die ersten Beobachtungen in dieser Hinsicht gehen auf *Schönbein*[2]) zurück. Eine entsprechende Wirkung bei Mikroorganismen wurde auch am Ende des letzten Jahrhunderts festgestellt. *Gottstein*[3]) fand 1893, daß „auch Mikroorganismen eine energische Spaltung des H_2O_2 bewirken“, und schlägt sogar diese H_2O_2-spaltende Eigenschaft derselben als eine makroskopische Reaktion für Bakterien vor. *Beijerinck*[4]) berichtet auch über die von Mikroorganismen verursachte H_2O_2-Spaltung. *Löwenstein*[5]) arbeitete mit den Filtraten (Pukalfilter) verschiedener Bakterienkulturen und konnte bei diesen auch eine entsprechende Wirkung feststellen.

Loew[6]) führt die Ursache der Spaltung von H_2O_2 auf ein besonderes Enzym zurück, das er Katalase nannte. Die Benennung „Superoxydase“ für dasselbe Enzym rührt von *Raudnitz*[7]) her. *Loew*[8]) unterscheidet zwei

---

[1]) *Euler* und *Blix*, H. **105**, 83, 1919.
[2]) *Schönbein*, Journ. f. prakt. Chem. **89**, 323, 1863.
[3]) *Gottstein*, Virchows Arch. f. path. Anat. **133**, 295, 1893.
[4]) *Beijerinck*, Naturw. Rundschau **8**, 1893.
[5]) *Löwenstein*, Münch. med. Wochenschr. **50**, Nr. 50, 1903.
[6]) *Loew*, Raport Nr. 68 of U. S. Depart. of Agricult. Washington 1901; Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., II. Abtl., **7**, 673, 1901.
[7]) *Raudnitz*, Chem. u. Physiol. der Milch. Wiesbaden 1903.
[8]) *Loew*, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., II. Abtl., **10**, 177, 1903.

Arten von Katalase, eine in Wasser unlösliche und eine in Wasser lösliche Katalase. Eine entsprechende Einteilung führte auch *Jorns*[1]) später ein. indem er den Ausdruck Endo- und Ektokatalase prägte. Die Ektokatalase wird von Bakterien in ihre Umgebung abgegeben, wogegen die Endokatalase erst nach Zerstörung der Bakterien freigegeben wird.

Neumann-Wender[2]) berichten 1904 über Hefekatalase. *Seligmann*[3]) gelang es, aus der Milch einen Kokkus zu isolieren, der sehr reich an Katalase war.

Die ersten Versuche, den Katalasegehalt der Mikroorganismen quantitativ zu ermitteln, rühren von *Orla-Jensen*[4]) und *D.* und *M. Rywosch*[5]) her. Der erstgenannte gibt als Maß für den Katalasegehalt die Anzahl Kubikzentimeter Sauerstoff, die unter gleichen Bedingungen entwickelt wird, an, ohne das geringere oder reichlichere Wachstum der verschiedenen Bakterien zu berücksichtigen, ein Fehler, der in fast allen bis jetzt erschienenen Untersuchungen über Bakterienkatalase gemacht worden ist. Die Arbeit von *Rywosch* ist prinzipiell von größerem Werte, denn hier wurden die an der Wasserstoffsuperoxydspaltung teilnehmenden Bakterienmengen berücksichtigt. Die auf Agar gewachsenen Bakterienschichten wurden erst gewogen und darauf die in Reaktionsflaschen entwickelten Gasvolumina gemessen. Die Menge des Sauerstoffs, welche innerhalb derselben Zeit (6 bis 8 Stunden) durch 1 mg Bakterien entwickelt wird, ist als Maß für den Katalasegehalt zu betrachten. Genaue Werte sind nach dieser Methode nicht zu erhalten, denn erstens variiert der Wassergehalt der Bakterienschichten auf Agar bedeutend und zweitens wird die Katalase bei verschiedenen Bakterien durch die langen Reaktionszeiten in verschiedenem Maße inaktiviert, wie aus unseren Versuchen hervorgeht.

Jorns[6]) hat den Einfluß der Temperatur, der H_2O_2-Konzentration, verschiedener Reagenzien usw. auf die Bakterienkatalase untersucht, sowie auch mit keimfreien Bakterienfiltraten gearbeitet. Jedoch geben uns die schönen Untersuchungen von *Jorns* „keine exakten Angaben über die absolute Größe der Katalaseproduktion“, denn hier wird nicht die Menge der vorhandenen Bakterien, sondern die Menge der Kulturflüssigkeit berücksichtigt. Denselben prinzipiellen Irrtum begeht auch *Jacoby*[7]), indem er den Einfluß verschiedener Nährböden auf den Katalasegehalt der Proteusbakterien untersucht. Er führt als wichtigstes Ergebnis an, daß „es erst zu einer kräftigen Katalasebildung kommt, wenn gleichzeitig Milchsäure in der Nährflüssigkeit vorhanden ist.“

Zu den wertvollsten Arbeiten über die Katalase in Mikroorganismen gehören ohne Zweifel die Untersuchungen von *Euler* und *Blix*[8]) und *Phragmén*[9]). Die genannten Forscher haben die Katalasewirksamkeit in der

---

[1]) *Jorns*, Arch. f. Hyg. **67**, 134, 1908.
[2]) *Neumann-Wender*, Chem.-Ztg. **28**, 300, 322, 1904.
[3]) *Seligmann*, Zeitschr. f. Hyg. **161**, 1906.
[4]) *Orla-Jensen*, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., II. Abtl. 18, 211, 1907.
[5]) *D.* und *M. Rywosch*, ebendaselbst, I. Abtl., **44**, 295, 1907.
[6]) *Jorns*, Arch. f. Hyg. **67**, 134, 1908.
[7]) *Jacoby*, diese Zeitschr. 88, 35, 1918.
[8]) *Euler* und *Blix*, l. c.
[9]) *Phragmén*, Medd. från Sv. Vet. Akad. Nobelinstitut **5**, Arrhenius-Festschrift 1919.

Hefe, die Kinetik der H_2O_2-Spaltung und die Abhängigkeit der Spaltung von p_H bestimmt, sowie die Einwirkung verschiedener Einflüsse auf die Wirksamkeit untersucht. Wegen der starken Erhöhung der Wirksamkeit durch Trocknen, Protoplasmagifte usw. war der Katalasegehalt in der Hefe quantitativ nicht zu bestimmen.

In neuester Zeit sind Arbeiten über die Bakterienkatalase von *Schlunk*[1]) und *Stapp*[2]) erschienen. Der erstgenannte ermittelt den Katalasegehalt einiger Bakterien mit einer sehr ungenauen Methode und „lehnt den Begriff Ektokatalase ab, und stellt sie in die Reihe der Aggressine ein“. Der in mancher Hinsicht wertvollen Arbeit von *Stapp* fehlt es leider auch an Exaktheit, denn es handelt sich nur um approximative Konzentrationen der Bakterienaufschwemmungen bei den quantitativen Versuchen.

II. Methodik.

Die Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds durch lebende Bakterien verläuft nach unseren Bestimmungen, wie schon *Jacoby*[3]) mit Proteusbakterien festgestellt hat, nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen, und die Reaktionskonstanten wachsen proportional mit der Bakterienzahl. Für die zahlenmäßige Charakterisierung des Katalasegehalts der verschiedenen Bakterien ist es darum genügend, die Reaktionskonstante und die Anzahl der an der Spaltung teilnehmenden Bakterien zu bestimmen. Durch den Quotienten $\frac{k}{\text{Zellenzahl}}$ läßt sich die Katalasewirkung der Bakterien ausdrücken, denn die Reaktionskonstanten der Wasserstoffsuperoxydspaltung sind von der Substratkonzentration unabhängig[4]).

Die Katalase hat ein sehr breites Optimum von 6,4 bis 8,0[5]). Da H_2O_2 bei alkalischer Reaktion spontan gespalten wird, sind alle unsere Versuche in einer Phosphatlösung vom $p_H = 6{,}5$ ausgeführt worden. Die Lösung war in den meisten Versuchen m/150 an Phosphat und n/10 an H_2O_2. Um die Einwirkung der Konzentration des Puffers und Wasserstoffsuperoxyds zu bestimmen, kamen in einigen Versuchen m/15 Phosphat- und n/100 Wasserstoffsuperoxydlösungen zur Anwendung. Die Versuchstemperatur war, wenn nichts anderes angegeben, 0^0 C.

Für die Bestimmung der H_2O_2-Spaltung wurde die Permanganatmethode, die nach den Angaben von *Jorns*[6]), *Michaelis* und *Pechstein*[7])

1) *Schlunk*, Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., I. Abt., **92**, 116, 1924.
2) *Stapp*, ebendaselbst, I. Abt., **92**, 160, 1924.
3) *Jacoby*, diese Zeitschr. **92**, 129, 1918.
4) Vgl. jedoch die Versuche mit n/100 und n/10 H_2O_2 mit B. prodigiosum.
5) *Rona* und *Damboviceanu*, diese Zeitschr. **134**, 2, 1922.
6) *Jorns*, l. c.
7) *Michaelis* und *Pechstein*, diese Zeitschr. **58**, 320, 1913.

und anderen die zuverlässigste sein soll, angewandt. Es wurde gewöhnlich mit n/40 Permanganatlösung unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure titriert, weil diese Konzentration für uns am geeignetsten schien. Die Bakterienzählung geschah direkt unter dem Mikroskop. Aus der mit Bakterien versetzten Pufferlösung wurden vor dem Zusatz von H_2O_2, nach kräftigem Schütteln, genau 5 ccm herauspipettiert und in eine Proberöhre, die 0,2 ccm Methylenblaulösung[1]) enthielt, gebracht. Nach dem Zusatz von 1 ccm sterilisierter Milch[2]) wurde die Lösung einige Zeit (15 bis 30 Minuten) bei 70^0 gehalten, worauf nach nochmaligem Schütteln 0,02 ccm herauspipettiert und auf einer Oberfläche von 20 × 24 qmm auf dem Objektglas verteilt wurden. Nach dem Trocknen bei Zimmertemperatur geschah die Zählung unter Anwendung des *Skar*schen Okulars. In der Regel wurden 60 Gesichtsfelder gezählt.

Die Bakterien wurden, wenn nicht anders angegeben, in steriler, geklärter, zuckerfreier Bouillon gezüchtet. Aus den Kulturen wurden je nach dem geringeren oder stärkeren Wachstum von 2 bis 5 ccm genommen und Pufferlösung bis 50 ccm zugegeben. Später wurden die Kulturen zuerst zentrifugiert und die von der Nährlösung befreiten Bakterienmassen in einer Phosphatlösung aufgeschwemmt. Die Zählung der Bakterien war dann leichter auszuführen und ergab bessere Resultate.

Um größere Volumenzunahme zu vermeiden, wurde in die mit Bakterien versetzte, eiskalte Phosphatlösung, nach dem Herausnehmen der Probe für die Bakterienzählung eine berechnete Menge einer konzentrierten Wasserstoffsuperoxydlösung hinzugefügt. Für die Titrationen mit Permanganat wurden stets 5 ccm herauspipettiert.

Was dann die Genauigkeit unserer Methode betrifft, so haben unsere Versuche gezeigt, daß die Bestimmung von k mit großer Exaktheit auszuführen ist. Die Zellenzählung bietet dagegen große Schwierigkeiten und gibt selbstverständlich niemals ganz exakte Werte. In dem Quotienten $\frac{k}{\text{Zellenzahl}}$ ist der Nenner daher die größte Fehlerquelle. Daß man jedoch eine sehr gute Konstanz für die Kat. f. derselben Bakterie bei verschiedenen Bestimmungen findet, geht aus den folgenden Versuchsserien hervor.

---

[1]) Die angewandte Methylenblaulösung wurde immer frisch bereitet, indem 0,5 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung und 1 ccm 0,02 proz. KOH-Lösung gemischt wurden. Die von *Skar* vorgeschlagene Carbolmethylenblaulösung erwies sich als weniger geeignet, weil dabei fast immer ein feinkörniger Niederschlag das Zählen erschwerte. Die *Loeffler*sche Methylenblaulösung färbte die Mikroorganismen zu schwach.

[2]) Vgl. *Virtanen*, H. **184**, 302, 1924.

Versuchsserie 1a.

B. lactis amari bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Kultur	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	$k = 1/t \log a/a - x$
—	25,9	—
4,0	20,8	0,0238
8,0	17,2	0,0222
10,5	14,9	0,0228
14,5	12,3	0,0223
19,5	9,75	0,0220
23,3	8,3	0,0212
	Mittel	0,0224

Zellenzahl: 110 . 10[6] in 1 ccm.

$$\text{Kat. f.} = \frac{k}{\text{Zellenzahl}} = 0{,}20 \cdot 10^{-9}.$$

Zeit in Minuten	7 Tage alte Kultur	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	$k = 1/t \log a/a - x$
—	26,05	—
4,3	22,2	0,0162
9,2	18,5	0,0161
14,4	15,5	0,0160
21,3	12,7	0,0150
30,7	9,5	0,0140
42,3	6,7	0,0140
	Mittel	0,0153

Zellenzahl: 90 . 10[6] in 1 ccm.

$$\text{Kat. f.} = \frac{k}{\text{Zellenzahl}} = 0{,}17 \cdot 10^{-9}.$$

Zeit in Minuten	2 Tage alte Kultur	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	k
—	24,8	—
6,8	18,7	0,018
12,1	15,4	0,017
17,8	12,6	0,017
24,2	9,95	0,016
29,6	8,3	0,016
38,8	6,1	0,016
	Mittel	0,017

Zellenzahl: 110 . 10[6] in 1 ccm.
Kat. f. = $0{,}15 \cdot 10^{-9}$.

Zeit in Minuten	2 Tage alte Kultur	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	k
—	24,4	—
13,0	16,5	0,013
20,4	13,5	0,013
27,8	10,75	0,013
35,7	8,75	0,012
49,5	6,05	0,012
	Mittel	0,013

Zellenzahl: 55 . 10[6] in 1 ccm.
Kat. f. = $0{,}24 \cdot 10^{-9}$.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	22,2	—
3,5	20,75	0,0083
6,9	19,6	0,0079
9,8	18,6	0,0078
12,5	17,7	0,0079
15,3	16,75	0,0080
17,9	15,92	0,0080
21,0	15,08	0,0080
	Mittel	0,0080

Zellenzahl: 41 . 10[6] in 1 ccm.
Kat. f. = $0{,}20 \cdot 10^{-9}$.

Zeit in Minuten	2 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	21,4	—
5,8	17,03	0,0171
8,8	15,3	0,0165
11,2	14,0	0,0164
13,9	12,77	0,0161
16,7	11,51	0,0161
20,9	9,98	0,0160
24,0	9,0	0,0157
26,3	8,3	0,0156
	Mittel	0,0162

Zellenzahl: 95 . 10[6] in 1 ccm.
Kat. f. = $0{,}17 \cdot 10^{-9}$.

Versuchsserie 1b.

Micrococcus Freudenreichii bei Zimmertemperatur gewachsen.
Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	4 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	10 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	17,4	—	—	20,25	—
2,9	15,28	0,018	4,0	18,53	0,0096
5,5	14,0	0,017	7,3	17,1	0,0100
7,9	12,53	0,018	10,3	16,0	0,0100
10,3	11,67	0,017	12,9	15,2	0,0096
12,6	10,61	0,017	16,2	14,1	0,0097
14,8	9,9	0,017	19,9	13,15	0,0094
17,2	9,12	0,016	21,8	12,7	0,0092
			24,1	12,0	0,0094
	Mittel	0,017		Mittel	0,0096

Zellenzahl: $36 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,47 . 10^{-9}$. — Zellenzahl: $19 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,5 . 10^{-9}$.

Versuchsserie 1c.

B. prodigiosum bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	2 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	4 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	21,02	—	—	14,85	—
2,9	16,8	0,0336	4,7	9,35	0,0430
5,1	14,1	0,0340	6,9	7,51	0,0430
7,1	12,0	0,0343	9,1	6,08	0,0426
9,5	10,0	0,0340	11,1	4,9	0,0434
11,7	8,45	0,0338	13,0	4,1	0,0430
13,9	7,15	0,0337	15,3	3,28	0,0428
16,4	6,0	0,0332	17,7	2,6	0,0427
18,1	5,1	0,0332	19,6	2,1	0,0433
	Mittel	0,0337		Mittel	0,0430

Zellenzahl: $235 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,14 . 10^{-9}$. — Zellenzahl: $350 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,12 . 10^{-9}$.

Wie aus den obigen und den später zu erwähnenden Versuchen hervorgeht, ist der Katalasegehalt der Bakterien ziemlich unabhängig von dem Alter der Kulturen. Zwar wird in älteren Kulturen eine bedeutend höhere Katalasewirksamkeit pro Zelle gefunden[1]), aber das beruht auf der teilweisen Autolyse der Zellen (s. das letzte Kapitel). Bei sehr alten Bakterienkulturen (von etwa 1 Monat an) kann eine Zellenzählung überhaupt nicht mehr in Frage kommen, da die Zellen

[1]) Ein ähnliches Verhalten hat *Vincennet* bei B. typhi festgestellt; C. r. soc. de Biol. **88**, 590; Chem. Centralbl. **1923**, III, 1036.

dann zum größten Teil durch Autolyse zerstört worden sind. Die Bestimmung des Katalasegehalts ist am besten mit einige Tage alten Kulturen auszuführen, denn die Zellenzählung gibt in solchen Kulturen die sichersten Resultate. Bei ganz jungen Kulturen, wenn die Zellen noch im Teilungszustand sind, ist es manchmal sehr schwer, die einzelnen Zellen zu unterscheiden.

Es sei zum Schluß noch bemerkt, daß wir bei unseren Bestimmungen den von der zugesetzten Bouillonkultur oder der zentrifugierten Bakterienmasse hervorgerufenen $KMnO_4$-Verbrauch nicht berücksichtigt haben. Bei einigen Parallelproben wurde nämlich festgestellt, daß eine solche Reduktion sehr minimal ist und viel langsamer erfolgt als die von freiem H_2O_2 hervorgerufene.

III. Einfluß der Versuchstemperatur auf die Reaktionskonstante *k*.

Unsere Bestimmungen wurden in der Regel, wie schon gesagt, bei 0° C ausgeführt. Die Konstanz von *k* war dabei überhaupt sehr gut. Bei einigen, bei Zimmertemperatur (etwa 20°) ausgeführten Versuchen war eine starke Inaktivierung der Katalase zu beobachten. Wir führen einige Versuche an.

Versuchsserie 2.

Bakterien bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	M. Freudenreichii, 5 Tage alt		Zeit in Minuten	B. prodigiosum, 5 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	3,9	—	—	3,9	—
10	3,4	0,0060	15	3,2	0,0057
27	3,2	0,0032	30	2,7	0,0053
43	3,1	0,0023	50	2,2	0,0050
73	3,0	0,0016	80	1,9	0,0040
118	3,0	inaktiviert	125	1,6	0,0031
178	3,0	„	185	1,3	0,0024

Die Werte zeigen in den beiden Versuchen ein stetiges Sinken. Die Inaktivierung der Katalase ist jedoch bei B. prodigiosum viel schwächer als bei M. Freudenreichii. Während der letztere nach etwa 80 Minuten seine Wirksamkeit total eingebüßt hat, beträgt die Inaktivierung nach derselben Zeit bei B. prodigiosum nur 30 Proz.

IV. Einfluß der Reaktionsdauer auf die Reaktionskonstante *k*.

Um der Einwirkung der Reaktionsdauer auf die Konstante *k* genügend lange Zeit folgen zu können, ist es notwendig, mit Aufschwemmungen zu arbeiten, die eine relativ geringe Bakterienmenge enthalten.

Die in nachstehenden Tabellen ausgeführten Versuche sind alle bei 0^0 ausgeführt. Es wurde hier mit n/10 $KMnO_4$ titriert.

Versuchsserie 3a.

Bakterien bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	M. sulfureus, 6 Tage alt		Zeit in Minuten	M. flavus, 6 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	4,4	—	—	4,4	—
26	3,7	0,0029	19	4,1	0,0016
61	3,2	0,0023	58	3,7	0,0013
111	2,9	0,0016	108	3,1	0,0014
171	2,6	0,0013	173	2,7	0,0012
396	2,2	0,0007	271	2,1	0,0012

Zeit in Minuten	M. aurantiacus, 11 Tage alt		Zeit in Minuten	M. pyogenes α-aureus, 5 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	5,2	—	—	4,9	—
7	4,9	0,0039	13	4,2	0,0052
19	4,7	0,0023	44	3,2	0,0042
37	4,4	0,0021	71	2,5	0,0041
94	4,2	0,0010	134	1,6	0,0036
175	4,0	0,0006	179	1,1	0,0036

Zeit in Minuten	B. latericium, 4 Tage alt		Zeit in Minuten	B. lactis viscosum, 5 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	5,4	—	—	4,9	—
9	5,0	0,0037	10	4,0	0,0088
35	4,4	0,0025	41	2,6	0,0067
68	3,8	0,0022	71	1,8	0,0061
118	3,0	0,0022	133	1,0	0,0059
190	2,4	0,0019	178	0,6	0,0051

Zeit in Minuten	B. lactis saponacei, 11 Tage alt		Zeit in Minuten	B. aerogenes, 44 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/10 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	5,2	—	—	5,1	—
12	5,0	0,0014	17	4,8	0,0016
45	4,5	0,0014	62	4,1	0,0015
87	4,0	0,0013	140	3,5	0,0012
176	3,4	0,0011	225	3,1	0,0010

Zeit in Minuten	B. mesentericus, 4 Tage alt		Zeit in Minuten	B. mesentericus ruber, 43 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,6	—	—	5,2	—
13	5,5	0,0006	16	4,8	0,0022
66	5,1	0,0006	63	4,2	0,0015
136	4,9	0,0004	140	3,6	0,0011
			228	3,1	0,0010

Versuchsserie 3b.

Bakterien bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	M. candicans, 7 Tage alt		Zeit in Minuten	M. candicans, 49 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,7	—	—	5,1	—
3,5	4,1	0,041	5	3,5	0,033
8	2,8	0,039	12	2,3	0,029
13	2,2	0,032	21	1,4	0,027
21	1,3	0,031	35	0,6	0,027
29	0,8	0,029	49	0,2	0,029

Zeit in Minuten	B. pyocyaneum, 7 Tage alt		Zeit in Minuten	B. pyocyaneum, 49 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,7	—	—	5,4	—
6	3,9	0,0275	11	4,3	0,0090
13	2,5	0,0275	21	3,6	0,0084
19	1,7	0,0277	41	2,6	0,0077
24	1,3	0,0267	58	2,1	0,0071
30	0,9	0,0267	124	0,8	0,0067
40	0,5	0,0264			

Zeit in Minuten	M. Freudenreichii, 7 Tage alt		Zeit in Minuten	M. Freudenreichii, 49 Tage alt	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,8	—	—	5,4	—
7	4,4	0,0171	8	4,9	0,0053
13	3,5	0,0169	21	4,6	0,0033
20	2,7	0,0166	52	3,9	0,0027
30	2,0	0,0154	132	3,3	0,0016
45	1,2	0,0152			
107	0,3	0,0120			

Versuchsserie 3c.

Zeit in Minuten	B. lactis amari, 2 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	B. prodigiosum, 2 Tage alte Kultur	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,0	—	—	5,0	—
10	4,6	0,0036	8	4,8	0,0022
19	4,4	0,0029	21	4,5	0,0022
52	3,8	0,0023	54	4,0	0,0018
116	2,8	0,0022	117	3,4	0,0014
195	2,1	0,0019	196	2,8	0,0013

Zeit in Minuten	B. lactis amari, 7 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	B. prodigiosum, 6 Tage alte Kultur	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,7	—	—	4,4	—
9	4,6	0,0103	16	3,9	0,0033
20	3,6	0,0100	57	2,9	0,0032
25	3,2	0,0100	117	2,0	0,0029
40	2,3	0,0099	172	1,4	0,0029
57	1,55	0,0099	267	0,8	0,0027
80	0,9	0,0100			

Zeit in Minuten	B. lactis amari, 16 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	B. prodigiosum, 16 Tage alte Kultur	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	4,8	—	—	4,4	—
6	3,5	0,0229	7	3,1	0,0217
11	2,5	0,0258	12	2,3	0,0237
17,5	1,7	0,0257	18	1,5	0,0260
23,5	1,1	0,0267	23	0,9	0,0299
32	0,7	0,0261	33	0,5	0,0286

Zeit in Minuten	B. lactis amari, 41 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	B. prodigiosum, 41 Tage alte Kultur	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,1	—	—	5,2	—
10	2,8	0,0260	11	4,1	0,0094
37	0,4	0,0299	38	2,2	0,0098
54	0,1	0,0316	61	1,3	0,0099
			86	0,7	0,0101
			132	0,2	0,0107

Bei den obigen Versuchen war die Phosphatlösung m/15 und, wie aus dem fünften Kapitel hervorgeht, wirkt diese Salzkonzentration schon inaktivierend auf die Katalasewirksamkeit der Bakterien. Trotzdem sind die Resultate aus den Versuchsserien in mancher Hinsicht interessant. Die Versuchsserie 5a zeigt uns, daß die Inaktivierung der Katalase bei verschiedenen Bakterien verschieden schnell vor sich geht. Die Konstante ist während des Reaktionsverlaufs nur sehr wenig bei M. flavus, B. lactis viscosum, B. lactis saponacei und B. aerogenes gesunken, sehr stark dagegen bei M. sulfureus und M. aurantiacus. In der Versuchsserie 5b sind die k-Werte bei jungen und alten Kulturen derselben Bakterien miteinander verglichen worden. Bei alten Kulturen von B. pyocyaneum und M. Freudenreichii ist eine stärkere Inaktivierung des Enzyms bemerkbar als bei entsprechenden jungen, bei M. coronatus scheint es dagegen umgekehrt zu sein.

Die Versuchsserie 5c gibt uns Auskunft über die Veränderungen der Reaktionskonstante mit dem Alter bei den Kulturen von B. lactis amari und B. prodigiosum. Bei den 2 Tage alten Kulturen hat eine bedeutende Inaktivierung des Enzyms stattgefunden, bei den 7 und 6 Tage alten Kulturen ist die Konstante ziemlich unverändert geblieben, um bei den 16 Tage alten Kulturen ein schwaches Ansteigen mit der Reaktionsdauer zu zeigen. Bei den 41 Tage alten Kulturen tritt besonders bei B. lactis amari das Ansteigen der Konstante deutlich hervor.

Eine genügende Erklärung für diese Verhältnisse läßt sich kaum finden. Doch belehren sie uns darüber, daß man die Katalasebestimmungen im Laufe einer kurzen Zeit ausführen muß, um konstante und vergleichbare k-Werte zu erhalten.

V. Einfluß der Puffer- und H_2O_2-Konzentrationen auf die Reaktionskonstante k.

Daß die Katalase bei stärkeren Wasserstoffsuperoxydkonzentrationen leicht inaktiviert wird, ist eine bekannte Tatsache. Es scheint jedoch, daß die Katalasen von verschiedener Herkunft und Reinheitsgrad nicht die gleiche Empfindlichkeit gegen H_2O_2 zeigen. *Euler*[1]) erhält eine gute Konstante erster Ordnung bei n/20 H_2O_2 und 0^0, *Senter*[2]) bei m/80 H_2O_2 und 0^0, *Hennichs*[3]), der mit Leberkatalase von sehr hohem Reinheitsgrad gearbeitet hat, findet ein schwaches Fallen der Konstante bei 0,01619 n H_2O_2.

Bezüglich der Pufferkonzentration empfehlen *Michaelis* und *Pechstein*[4]) Acetatmischungen von n/200, da die Salzwirkung bei stärkerer Konzentration oder bei Anwendung von Phosphat eintritt. *Rona* und *Damboviceanu*[5]) erhalten keine Salzwirkung mit n/150 Phosphat.

Um den Einfluß der Konzentration von H_2O_2 und Puffer auf die Katalasewirksamkeit der Bakterien zu bestimmen, haben wir Versuche mit n/10 und n/100 H_2O_2 sowie m/15 und m/150 Phosphat ausgeführt. Die Bakterien wurden hierbei nicht gezählt, die Parallelversuche von denselben Bakterien enthalten jedoch dieselbe Anzahl Bakterien, so daß die k-Werte miteinander vergleichbar sind.

---

[1]) *Euler*, Hofmeisters Beitr. **7**, **1**, 1906.
[2]) *Senter*, Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 157, 1903; **51**, 673, 1905.
[3]) *Hennichs*, diese Zeitschr. **145**, 289, 1924.
[4]) *Michaelis* und *Pechstein*, l. c.
[5]) *Rona* und *Damboviceanu*, l. c.

Versuchsserie 4a.

M. Freudenreichii bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/15 Phosphat. 21 Tage alte Kultur.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2 n/10 $KMnO_4$ ccm	n/10 H_2O_2 k	Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2 n/50 $KMnO_4$ ccm	n/100 H_2O_2 k
—	5,25	—	—	3,2	—
9	3,0	0,0270	7	1,8	0,0357
16	2,2	0,0236	12	1,2	0,0355
23	1,45	0,0243	17	1,0	0,0310
31	0,8	0,0264	23,5	0,8	0,0256
40	0,65	0,0227	29	0,7	0,0239
54	0,4	0,0210		0,6	

Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2 n/10 $KMnO_4$ ccm	n/10 H_2O_2 k	Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2 n/50 $KMnO_4$ ccm	n/100 H_2O_2 k
—	5,0	—	—	3,2	—
7,5	3,1	0,0276	7	1,9	0,0323
14,5	2,2	0,0246	12	1,3	0,0326
22,5	1,35	0,0252	17	1,05	0,0285
30,5	1,05	0,0222	24	0,85	0,0240
39	0,65	0,0227	32	0,7	0,0206
51	0,35	0,0226	42	0,6	0,0173

Versuchsserie 4b.

M. Freudenreichii bei Zimmertemperatur gewachsen. 3 Tage alte Kultur. Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2 n/40 $KMnO_4$ ccm	n/10 H_2O_2 k	Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2 n/40 $KMnO_4$ ccm	n/100 H_2O_2 k
—	20,6	—	—	2,13	—
4,8	17,75	0,0134	2,1	2,0	0,0130
7,2	16,45	0,0135	4,4	1,82	0,0155
9,8	15,35	0,0130	7,4	1,65	0,0149
12,5	14,3	0,0127	10,1	1,48	0,0156
15,6	13,2	0,0124	12,7	1,35	0,0155
18,2	12,4	0,0121	16	1,23	0,0149
31,1	9,4	0,0110	19,5	1,05	0,0157
33,8	8,9	0,0108	24,7	0,9	0,0151

Versuchsserie 4c.

B. prodigiosum bei Zimmertemperatur gewachsen. 25 Tage alte Kultur. Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2		Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	16,8	—	—	1,52	—
2,5	15,15	0,0180	2,1	1,3	0,0323
4,8	13,8	0,0178	4,6	1,1	0,0305
8,0	12,35	0,0167	7,1	0,93	0,0300
10,2	11,18	0,0173	9,6	0,8	0,0290
12,7	9,98	0,0178	11,8	0,65	0,0312
15,2	9,15	0,0173	13,8	0,55	0,0320
17,3	8,0	0,0186	15,9	0,47	0,0320
19,4	7,23	0,0188	17,8	0,4	0,0326
—	—	—	20,7	0,33	0,0320

Versuchsserie 4d.

B. prodigiosum bei Zimmertemperatur gewachsen. 3 Tage alte Kultur. Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2		Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/50 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	24,0	—	—	2,7	—
11	19,8	0,0076	3,5	2,4	0,0146
18	18,4	0,0064	7,5	2,2	0,0119
32	15,6	0,0058	13,5	1,8	0,0130
49,5	12,8	0,0056	25,5	1,4	0,0112
76	9,5	0,0053	31,5	1,2	0,0112
113	6,4	0,0051	46,0	0,85	0,0109
161	3,9	0,0049	66,5	0,6	0,0100

Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	n/10 H_2O_2		Zeit in Minuten	n/100 H_2O_2	
	n/50 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/50 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	24,5	—	—	2,65	—
6,3	22,5	0,005 87	4	2,4	0,0108
16	19,7	0,005 92	7	2,2	0,0115
27	17,2	0,005 69	15	1,7	0,0120
35	15,6	0,005 60	27	1,4	0,0103
48,5	13,3	0,005 47	35	1,15	0,0104
85	9,2	0,005 00	42	1,0	0,0101
121	6,2	0,004 93	60	0,7	0,0096
170	3,4	0,005 01	—	—	—

Versuchsserie 4e.

B. lactis amari bei Zimmertemperatur gewachsen. 21 Tage alte Kultur.
Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	$n/10\ H_2O_2$		Zeit in Minuten	$n/100\ H_2O_2$	
	$n/10\ KMnO_4$ ccm	k		$n/100\ KMnO_4$ ccm	k
—	5,1	—	—	3,6	—
3	3,7	0,0465	5	2,3	0,0389
8	2,5	0,0387	9,5	1,7	0,0343
16	1,4	0,0351	13	1,4	0,0316
21	1,0	0,0337	20	1,2	0,0239
35	0,4	0,0316	38	0,8	0,0172
42	0,3	0,0293	—	—	—

Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	$n/10\ H_2O_2$		Zeit in Minuten	$n/100\ H_2O_2$	
	$n/10\ KMnO_4$ ccm	k		$n/50\ KMnO_4$ ccm	k
—	5,0	—	—	2,8	—
4	3,7	0,033	4	2,0	0,037
11	2,3	0,031	9	1,5	0,030
19	1,3	0,031	14	1,1	0,029
26	0,8	0,031	19	0,9	0,026
36	0,4	0,030	22	0,8	0,025
43	0,2	0,032	29	0,6	0,023

Versuchsserie 4f.

B. lactis amari bei Zimmertemperatur gewachsen. 2 Tage alte Kultur.
Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	$n/10\ H_2O_2$		Zeit in Minuten	$n/100\ H_2O_2$	
	$n/40\ KMnO_4$ ccm	k		$n/40\ KMnO_4$ ccm	k
—	21,4	—	—	2,21	—
5,8	17,03	0,0171	3,1	1,95	0,0175
8,8	15,3	0,0165	6,4	1,7	0,0178
11,2	14,0	0,0164	9,2	1,53	0,0173
13,9	12,77	0,0161	12,3	1,33	0,0179
16,7	11,51	0,0161	15,3	1,2	0,0173
20,9	9,98	0,0160	18,5	1,08	0,0168
24,0	9,0	0,0157	22,2	0,98	0,0160
26,3	8,3	0,0156	26,3	0,8	0,0167

Aus den obigen Versuchsserien geht hervor, daß konstantere k-Werte mit m/150 Pufferlösungen erhalten werden als mit m/15. Die Salzwirkung ist jedoch nicht sehr stark, m/150 Phosphat übt überhaupt keine Salzwirkung mehr aus.

Die von uns angewandten H_2O_2-Konzentrationen, n/10 und n/100, rufen bei M. Freudenreichii und B. lactis amari keine nennenswerte Einwirkung auf die Reaktionskonstanten hervor. Die Reaktions-

konstante ist also unabhängig von der Substratkonzentration. Bei B. prodigiosum sind die k-Werte dagegen in n/100 H_2O_2-Lösungen etwa doppelt so groß als in n/10 H_2O_2-Lösung. Eine genügende Erklärung für diese Erscheinung ist schwer zu finden. Vielleicht steht das bei B. prodigiosum oftmals konstatierte und im Kapitel IV schon erwähnte Ansteigen der Reaktionskonstante mit der Reaktionsdauer auch im Zusammenhang mit der Verminderung der H_2O_2-Konzentration während des Versuchs.

VI. Einfluß der Wachstumstemperatur auf den Katalasegehalt einiger Bakterien.

Um die Einwirkung der Wachstumstemperatur auf die Katalasebildung in Bakterien zu ermitteln, wurden Parallelbestimmungen mit den bei Zimmertemperatur (etwa 20⁰), 27 und 37⁰ gewachsenen Kulturen ausgeführt.

Versuchsserie 5.
Puffer: m/150 Phosphat.
M. Freudenreichii.

Zeit in Minuten	3 Tage bei 27⁰ gewachsene Kultur		Zeit in Minuten	3 Tage bei 37⁰ gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,6	—	—	20,3	—
4,8	17,75	0,0134	8,9	17,65	0,0068
7,2	16,45	0,0135	19,8	14,65	0,0071
9,8	15,35	0,0130	26,7	13,2	0,0070
12,5	14,3	0,0127	43,4	10,35	0,0067
15,6	13,2	0,0124	56,3	8,55	0,0066
18,2	12,4	0,0121	75,7	6,4	0,0066
	Mittel	0,0128		Mittel	0,0068

Zellenzahl: 29 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,44 . 10−⁹. — Zellenzahl: 18 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,38 . 10−⁹.

(Kat. f. bei 20⁰ = 0,49 . 10−⁹).

B. Zopfii.

Zeit in Minuten	10 Tage bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur		Zeit in Minuten	5 Tage bei 37⁰ gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,1	—	—	23,25	—
4,8	17,9	0,0104	17,5	20,0	0,0037
10,1	16,1	0,0096	28,9	19,4	0,0027
15,4	14,63	0,0090	44,7	17,95	0,0025
20,6	13,5	0,0084	54,4	17,5	0,0023
27,4	12,1	0,0080	69,9	16,6	0,0021
33,4	10,98	0,0079	133,5	14,2	0,0016
39,1	10,07	0,0076			
	Mittel	0,0087		Mittel	0,0025

Zellenzahl: 14 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,62 . 10−⁹. — Zellenzahl: 15 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,17 . 10−⁹.

B. prodigiosum.

Zeit in Minuten	3 Tage bei 27° gewachsene Kultur		Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	18,15	—	—	22,0	—
2,3	16,8	0,0146	2,9	21,77	0,0015
4,8	15,5	0,0143	6,8	21,5	0,0014
7,6	14,1	0,0144	12,6	21,3	0,0011
9,8	13,1	0,0144	19,7	20,85	0,0012
11,9	12,2	0,0145	40,6	19,9	0,0011
14,1	11,3	0,0146	44,5	19,6	0,0011
16,1	10,4	0,0150	56,5	19,0	0,0011
21,2	8,7	0,0150	63,4	18,5	0,0012
	Mittel	0,0146		Mittel	0,0012

Zellenzahl: $155 \cdot 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. $= 0,09 \cdot 10^{-9}$.

Zellenzahl[1]: etwa $20 \cdot 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. $= 0,06 \cdot 10^{-9}$.

Kat. f. bei 20° $= 0,13 \cdot 10^{-9}$.

Wie aus den obigen Versuchen hervorgeht, hat die Wachstumstemperatur auf die Katalasebildung der verschiedenen Bakterien nicht in eindeutiger Weise eingewirkt. Die Vergleichung der Kat. f. von den bei Zimmertemperatur gewachsenen Bakterien mit denjenigen bei 27 und 37° gewachsenen zeigt, daß die höhere Wachstumstemperatur bei M. Freudenreichii keine nennenswerte Einwirkung auf die Kat. f. ausgeübt hat, daß dagegen bei B. Zopfii eine Wachstumstemperatur von 37° eine bedeutende Verringerung der Kat. f. hervorgerufen hat.

Was die Katalasebildung bei B. prodigiosum anbetrifft, so ist die interessante Tatsache zu konstatieren, daß die Kat. f. der bei Zimmertemperatur gewachsenen Bakterien bedeutend höher ist als derjenigen bei 37° gewachsenen, obwohl die Zellen bei 37° vielmal größer als bei 20° waren. Der Katalasegehalt der Bakterien scheint unabhängig von der Zellengröße zu sein.

VII. Versuche zur Aktivierung der Katalase in Bakterien.

Die interessanten Befunde von *Euler* und *Blix* über die Verstärkung der Katalasewirkung in Hefezellen durch Protoplasmagifte, Trocknen an der Luft und Erwärmen haben uns veranlaßt, das Verhalten der Bakterien in dieser Hinsicht zu untersuchen. Für unsere quantitative Katalasebestimmung sind diese Eingriffe nämlich von entscheidender Bedeutung. Wird die Katalasewirksamkeit durch äußere Einflüsse erhöht, so kann natürlich von einer konstanten Kat. f. bei den Bakterien nicht die Rede sein.

[1]) Die Form und Größe der Zellen variierte sehr. Die Zellen waren zum größten Teil vielmal länger als die bei Zimmertemperatur gewachsenen.

Unsere Versuche zur Aktivierung der Katalase wurden mit M. Freudenreichii und B. prodigiosum, welche nach den früher erwähnten Versuchen bezüglich der Inaktivierung der Katalase ein verschiedenes Verhalten zeigen, ausgeführt.

1. Einwirkung von Protoplasmagiften auf die Katalasewirkung der Bakterien.

Als Protoplasmagifte kamen bei unseren Versuchen, welche sowohl mit jungen als mit alten Kulturen ausgeführt wurden, Chloroform und Xylol zur Anwendung. Außer dem Kontrollversuch wurden mit jeder Bakterie zwei Bestimmungen in Gegenwart von Protoplasmagift angestellt. Bei der einen wurde das Protoplasmagift einige Minuten vor der Ausführung der Bestimmung zugesetzt, bei der anderen ließ man das Gift etwa 20 Stunden bei 0° auf die Bakterienemulsion einwirken. Die k-Werte sind in den Versuchen mit derselben Bakterie von demselben Alter miteinander vergleichbar, denn die Bakterienanzahl war dieselbe.

Versuchsserie 6.

M. Freudenreichii.

Zeit in Minuten	28 Tage alte Kultur ohne Chloroform		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur ohne Chloroform	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	24,4	—	—	20,6	—
9	21,6	0,0059	4,8	17,75	0,0134
20,9	19,5	0,0047	7,2	16,45	0,0135
36,9	17,85	0,0037	9,8	15,35	0,0130
64,8	15,3	0,0031	12,5	14,3	0,0127
104,1	12,9	0,0026	15,6	13,2	0,0124
128,2	11,65	0,0025	18,2	12,4	0,0121
			31,1	9,4	0,0110
			33,8	8,9	0,0108
	Mittel	0,0038		Mittel	0,0126

Zeit in Minuten	28 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,95	—	—	18,05	—
2,8	20,35	0,0045	2,3	16,75	0,0141
14,5	18,2	0,0042	5,2	15,5	0,0127
25,6	17,05	0,0035	7,7	14,6	0,0120
35,5	16,2	0,0034	10,2	13,83	0,0113
52,2	15,2	0,0027	12,7	12,98	0,0112
73,6	14,1	0,0023	16,0	12,07	0,0110
104,3	12,7	0,0021	18,7	11,4	0,0107
108,8	12,45	0,0021	21,2	10,8	0,0106
			25,5	9,85	0,0103
	Mittel	0,0031		Mittel	0,0115

Zeit in Minuten	28 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform, Einwirkung etwa 20 Stunden		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform, Einwirkung etwa 20 Stunden	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	21,05	—	—	18,9	—
4,2	20,5	0,0027	2,5	17,5	0,0133
14,8	18,8	0,0033	5,1	16,3	0,0126
28,8	17,8	0,0025	7,5	15,2	0,0126
43,8	16,75	0,0023	10,0	14,23	0,0123
67,3	15,7	0,0019	12,7	13,2	0,0122
109,9	14,0	0,0016	15,1	12,43	0,0120
182,8	11,2	0,0015	19,9	11,02	0,0118
			23,0	10,3	0,0115
	Mittel	0,0023		Mittel	0,0123

B. prodigiosum.

Zeit in Minuten	15 Tage alte Kultur ohne Protoplasmagift		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur ohne Protoplasmagift	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,3	—	—	18,15	—
3,2	18,3	0,0072	2,3	16,8	0,0146
9,2	16,3	0,0079	4,8	15,5	0,0143
16,5	14,6	0,0073	7,6	14,1	0,0144
22	13,1	0,0077	9,8	13,1	0,0144
32	10,9	0,0078	11,9	12,2	0,0145
45,5	8,4	0,0079	14,1	11,3	0,0146
58,8	6,6	0,0079	16,1	10,4	0,0150
102,6	2,75	0,0082	21,2	8,7	0,0150
	Mittel	0,0077		Mittel	0,0146

Zeit in Minuten	15 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,75	—	—	17,35	—
8,6	17,0	0,0076	2,7	15,8	0,0150
17,5	14,8	0,0072	5,4	14,4	0,0150
27,7	12,5	0,0071	7,7	13,3	0,0150
37,4	10,5	0,0073	10,0	12,4	0,0146
48,2	8,8	0,0073	12,4	11,25	0,0151
56,8	7,5	0,0074	16,4	9,8	0,0151
67	6,1	0,0076	19,1	8,7	0,0156
76,6	4,9	0,0079	23,1	7,2	0,0165
	Mittel	0,0074		Mittel	0,0152

Zeit in Minuten	15 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform, Einwirkung etwa 20 Stunden		Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur mit 1 ccm Chloroform, Einwirkung etwa 20 Stunden	
	n/40 K Mn O_4 ccm	k		n/40 K Mn O_4 ccm	k
—	21,8	—	—	20,2	—
3,6	20,2	0,0092	2,6	18,83	0,0120
7,2	19,0	0,0083	5,4	17,15	0,0131
12,4	17,25	0,0082	8,1	15,68	0,0136
23,9	14,4	0,0075	10,9	14,2	0,0140
32	12,3	0,0078	13,8	12,4	0,0153
39,6	10,3	0,0082	16,5	11,05	0,0158
47,8	8,5	0,0086	18,8	9,75	0,0168
71	4,25	0,0100	22,3	7,9	0,0182
	Mittel	0,0085		Mittel	0,0149

Zeit in Minuten	15 Tage alte Kultur mit 1 ccm Xylol		Zeit in Minuten	15 Tage alte Kultur mit 1 ccm Xylol, Einwirkung etwa 20 Stdn.	
	n/40 K Mn O_4 ccm	k		n/40 K Mn O_4 ccm	k
—	18,3	—	—	22,15	—
8,1	15,9	0,0075	3,7	20,9	0,0068
16	13,65	0,0080	10,2	18,35	0,0080
27,2	11,3	0,0077	17,4	16,25	0,0077
36,3	9,45	0,0079	25,1	14,25	0,0076
47,1	7,3	0,0085	33,1	12,15	0,0079
55,4	6,0	0,0087	38,4	10,4	0,0085
66,1	4,6	0,0091	51,2	7,7	0,0090
75,6	3,3	0,0098	62,9	5,2	0,0100
	Mittel	0,0084		Mittel	0,0082

Durch die Protoplasmagifte wird also keine Erhöhung der Katalasewirkung erreicht. Eine nennenswerte Inaktivierung hat auch nicht stattgefunden. Das stimmt vollständig mit dem Befunde von *Jacoby*[1]) überein, der innerhalb 22½ Stunden mit Toluol keine Schwächung der Katalasewirkung bei Proteusbakterien feststellen konnte. *Stapp*[2]) hat dagegen — allerdings mit einem Chloroform-Acetongemisch — bei B. prodigiosum bereits innerhalb 5 Stunden eine bedeutende Inaktivierung der Katalase konstatiert.

2. Einfluß des Erwärmens auf die Katalasewirkung der Bakterien.

Versuche über die Einwirkung des Erwärmens auf die Bakterienkatalase sind früher von *Jorns*[3]) und *Stapp* ausgeführt worden. *Jorns* arbeitete mit keimfreien Filtraten von B. prodigiosum und konnte

[1]) *Jacoby*, l. c.
[2]) *Stapp*, l. c.
[3]) *Jorns*, l. c.

eine allmähliche Inaktivierung durch längeres Erhitzen schon bei 55⁰ feststellen. Das Erhitzen bei 70⁰ zerstört nach ihm in 30 Minuten das Enzym vollständig. Nach *Stapp* wird eine völlige Inaktivierung der Katalase bei B. prodigiosum bei 80⁰ in 15 Minuten erreicht.

Nach *Euler* und *Blix* ruft eine ½- bis 2stündige Erwärmung auf etwa 55 bis 63⁰ eine 20- bis 30fache Aktivierung der Katalasewirkung bei der Hefe hervor.

Das Verhalten der Katalase in Bakterien gegen Erwärmung wurde in einigen Versuchsserien untersucht, wobei die Bakterienemulsionen in m/150 Phosphatlösung 1 Stunde auf 45 bis 65⁰ erwärmt wurden. Die Bakterienanzahl in denselben Serien war dieselbe, so daß die *k*-Werte miteinander vergleichbar sind.

Versuchsserie 7a.

B. prodigiosum, 4 Tage alte Kultur.

Zeit in Minuten	1. Kontrollversuch ohne Erwärmen	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	14,85	—
4,7	9,35	0,0430
6,9	7,51	0,0430
9,1	6,08	0,0426
11,1	4,90	0,0434
13,0	4,10	0,0430
15,3	3,28	0,0428
17,7	2,60	0,0427
19,6	2,10	0,0433
	Mittel	0,0430

Zellenzahl: 350 . 10⁶ in 1 ccm.

Zeit in Minuten	2. 1 Stunde bei 50⁰ erwärmt	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	14,53	—
1,9	11,35	0,0564
4,5	8,37	0,0532
6,5	6,5	0,0537
8,3	5,25	0,0532
10,4	4,10	0,0528
12,2	3,28	0,0530
14,2	2,40	0,0550
16,4	1,80	0,0553
18,3	1,33	0,0567
20,6	0,90	0,0586
	Mittel	0,0548

M. Freudenreichii, 4 Tage alte Kultur.

Zeit in Minuten	1. Kontrollversuch ohne Erwärmen	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	17,40	—
2,9	15,38	0,0184
5,5	14,00	0,0171
7,9	12,53	0,0180
10,3	11,67	0,0170
12,6	10,61	0,0170
14,8	9,90	0,0170
17,2	9,12	0,0163
	Mittel	0,0173

Zellenzahl: 36 . 10⁶ in 1 ccm.

Zeit in Minuten	2. 1 Stunde bei 50⁰ erwärmt	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	18,01	—
2,4	16,60	0,0147
4,4	15,50	0,0148
6,6	14,56	0,0140
8,8	13,72	0,0134
11,5	12,82	0,0128
13,8	12,00	0,0127
16,1	11,32	0,0125
18,6	10,70	0,0121
21,2	10,15	0,0117
	Mittel	0,0132

Zeit in Minuten	3. 1 Stunde bei 55⁰ erwärmt		Zeit in Minuten	3. 1 Stunde bei 55⁰ erwärmt	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	14,22	—	—	17,80	—
2,4	10,58	0,0535	2,7	16,20	0,0150
4,4	8,42	0,0517	5,0	15,10	0,0143
6,0	7,05	0,0508	7,4	14,11	0,0136
7,9	5,65	0,0507	9,6	13,47	0,0126
9,8	4,46	0,0513	11,9	12,75	0,0122
11,6	3,62	0,0512	14,1	12,13	0,0118
13,6	2,78	0,0521	16,1	11,61	0,0115
15,3	2,26	0,0518	18,4	11,05	0,0112
	Mittel	0,0516		Mittel	0,0128

Zeit in Minuten	4. 1 Stunde bei 60⁰ erwärmt		Zeit in Minuten	4. 1 Stunde bei 60⁰ erwärmt	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	16,10	—	—	18,00	—
2,2	13,14	0,0401	2,6	16,68	0,0127
4,7	10,83	0,0366	5,2	15,76	0,0111
7,0	9,21	0,0347	7,8	14,85	0,0107
9,2	7,73	0,0346	10,2	14,11	0,0103
11,7	6,42	0,0341	12,5	13,50	0,0100
13,9	5,37	0,0343	14,8	13,00	0,0096
16,4	4,35	0,0346	16,9	12,43	0,0095
18,9	3,58	0,0345	19,2	11,90	0,0093
21,0	2,90	0,0354	21,4	11,38	0,0093
23,5	2,32	0,0359			
	Mittel	0,0355		Mittel	0,0103

Zeit in Minuten	5. 1 Stunde bei 65⁰ erwärmt		Zeit in Minuten	5. 1 Stunde bei 65⁰ erwärmt	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	16,92	—	—	18,80	—
2,8	15,07	0,0179	2,7	18,10	0,0061
4,9	13,82	0,0179	5,2	17,56	0,0059
7,3	12,78	0,0167	7,6	17,15	0,0052
9,6	11,71	0,0167	10,1	16,77	0,0049
11,8	10,82	0,0165	12,3	16,42	0,0047
14,3	9,91	0,0162	15,5	16,00	0,0045
19,1	8,42	0,0159	18,2	15,70	0,0043
20,9	7,86	0,0159	22,5	15,18	0,0041
			25,4	14,80	0,0041
	Mittel	0,0167		Mittel	0,0049

Die Versuche zeigen, daß eine stärkere Inaktivierung der Katalase bei den beiden Bakterien erst bei 65⁰ eintritt. Bei B. prodigiosum ist eine ganz schwache, bei M. Freudenreichii keine Aktivitätserhöhung

durch Erwärmen auf 50 und 55° zu beobachten. Da es möglich war, daß eine Erwärmung auf andere Wärmegrade über und unter 50° stärkere Aktivierung hervorruft, wurde eine neue Versuchsserie mit B. prodigiosum angestellt.

Versuchsserie 7 b.

B. prodigiosum.

Zeit in Minuten	Kontrollversuch ohne Erwärmen: n/40 $KMnO_4$ ccm	Kontrollversuch ohne Erwärmen: k	Zeit in Minuten	1 Stunde bei 45° erwärmt: n/40 $KMnO_4$ ccm	1 Stunde bei 45° erwärmt: k
—	16,05	—	—	15,9	—
2,4	13,82	0,0312	3	13,4	0,0248
5,6	11,6	0,0252	5,5	11,75	0,0239
8,4	9,9	0,0250	8,3	9,9	0,0248
10,8	8,6	0,0251	11	8,41	0,0251
13,6	7,3	0,0251	13,9	7,16	0,0249
16,5	6,02	0,0258	17,4	5,7	0,0256
18,8	5,2	0,0260	20,8	4,62	0,0258
22,5	4,1	0,0263	23,2	4,02	0,0258
	Mittel	0,0262		Mittel	0,0251

Zeit in Minuten	1 Stunde bei 47,5° erwärmt: n/40 $KMnO_4$ ccm	1 Stunde bei 47,5° erwärmt: k	Zeit in Minuten	1 Stunde bei 52,5° erwärmt: n/40 $KMnO_4$ ccm	1 Stunde bei 52,5° erwärmt: k
—	15,88	—	—	16,1	—
2,7	13,87	0,0220	2,8	13,78	0,0241
6,1	11,91	0,0237	5,7	11,87	0,0232
9,6	10,0	0,0210	8	10,3	0,0243
12,4	8,45	0,0221	10,9	8,8	0,0241
15,6	7,2	0,0220	13,6	7,55	0,0241
19	5,98	0,0223	15,9	6,38	0,0252
22,4	4,9	0,0228	19,9	5,0	0,0255
24,9	4,13	0,0234	22,1	4,2	0,0264
	Mittel	0,0224		Mittel	0,0246

In den obigen Versuchen hat das Erwärmen auf 45 bis 52,5° die Aktivität nicht um das geringste erhöht. Zusammenfassend kann man also sagen, daß bei den untersuchten Bakterien keine Aktivierung der Katalase durch Erwärmen erreicht worden ist.

3. *Einfluß der Trocknung der Bakterien auf die Katalasewirkung.*

Zur Herstellung der Trockenpräparate von verschiedenen Bakterien wurden die Bouillonkulturen von den resp. Bakterien zentrifugiert, die abgeschiedenen Bakterienmassen mit Wasser gewaschen und dann auf einem porösen Tonteller getrocknet. Aus der feuchten Bakterien-

masse wurden jedoch vor dem Ausbreiten auf Tonteller abgewogene Mengen 1. zur Trockensubstanzbestimmung, 2. zur Bakterienzählung und 3. zur Katalasebestimmung genommen. Nach dem Trocknen ist es unmöglich, eine homogene Bakterienemulsion zu erhalten und die Bakterien zu zählen. Wenn aber der Wassergehalt und die Bakterienzahl in der feuchten Bakterienmasse bekannt sind, kann man die Anzahl der Bakterien auch im Trockenpräparat leicht berechnen[1]).

Versuchsserie 8.

B. prodigiosum, 14 Tage bei Zimmertemperatur gewachsen. Wassergehalt der feuchten Bakterienmasse 92,64 Proz. Zellenzahl in 1 mg der feuchten Bakterienmasse im Mittel von zwei Bestimmungen $120 \cdot 10^6$ ($122 \cdot 10^6$ und $118 \cdot 10^6$).

Puffer: m/150 Phosphat.

Zeit in Minuten	Feuchte Bakterienmasse		Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 20stündigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller	
	n/10 $KMnO_4$ ccm	k		n/10 $KMnO_4$ ccm	k
—	5,8	—	—	5,3	—
3,5	4,7	0,0261	2,5	3,0	0,0988
12,5	2,7	0,0265	5	1,6	0,1043
21	1,5	0,0279	8	0,7	0,1099
29	0,7	0,0316	11	0,2	0,1294
35	0,4	0,0332			
	Mittel	0,0291		Mittel	0,1106

Zellenzahl: $110 \cdot 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. $= 0,26 \cdot 10^{-9}$.

Ber. Zellenzahl: $375 \cdot 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. $= 0,30 \cdot 10^{-9}$.

Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 28tägigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller		Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 28tägigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	22,0	—	23,5	8,2	0,0182
3,4	18,85	0,0197	31,5	5,9	0,0182
7,0	16,45	0,0180	37,3	4,45	0,0186
12,2	13,1	0,0184	50,2	2,5	0,0188
17,9	10,5	0,0180			

Mittel 0,0185

Berechnete Zellenzahl: $116 \cdot 10^6$ in 1 ccm.
Kat. f. $= 0,16 \cdot 10^{-9}$.

[1]) *Virtanen*, l. c.

M. Freudenreichii, 16 Tage bei Zimmertemperatur gewachsen. Wassergehalt der feuchten Bakterienmasse 88,7 Proz. Zellenzahl in 1 mg der feuchten Bakterienmasse im Mittel von zwei Bestimmungen 98 . 10^6 (109 . 10^6 und 87 . 10^6).

Puffer: m/15 Phosphat.

Zeit in Minuten	Feuchte Bakterienmasse *k*	Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller *k*
4,0	0,0477	2,4	0,0366
7	0,0501	5,0	0,0350
9,8	0,0490	7,7	0,0348
12	0,0505	10,3	0,0346
14	0,0516	13,5	0,0346
17	0,0503	17,0	0,0362
19,3	0,0510	20,8	0,0360
		24,2	0,0368
	Mittel 0,050		Mittel 0,0356

Zellenzahl: 47 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 1,1 . 10^{-9}. — Zellenzahl: 62 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,57 . 10^{-9}.

Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 3tägigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*	Zeit in Minuten	Trockenpräparat nach 8tägigem Stehen bei Zimmertemperatur auf Tonteller n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	16,2	—	—	21,9	—
2,3	9,3	0,1048	3	16,5	0,04098
4,6	5,4	0,1037	5,7	13,2	0,0385
6,8	3,5	0,0978	10,3	9,0	0,0375
9,8	1,8	0,0973	15,8	5,7	0,0370
12,7	0,8	0,1028	18,7	4,5	0,0368
15,4	0,55	0,0954	22,5	3,3	0,0365
			28,6	2,1	0,0356
	Mittel	0,100		Mittel	0,0376

Ber. Zellenzahl: 98 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 1,0 . 10^{-9}. — Ber. Zellenzahl: 42 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,9 . 10^{-9}.

Die Versuche zeigen, daß die Trocknung der Bakterien die Katalasewirksamkeit nicht erhöht. Der Wassergehalt der Trockenpräparate wurde nur bei dem 8 Tage alten Trockenpräparat von M. Freudenreichii berücksichtigt. Da der Wassergehalt in den anderen Trockenpräparaten schätzungsweise 5 bis 10 Proz. war, wird die Kat. f. unter Berücksichtigung des Wassergehaltes nicht erwähnenswert erhöht. Übrigens sind die Fehler beim Arbeiten mit Trockenpräparaten größer als mit lebenden Bakterien, so daß man aus kleineren Abweichungen in Kat. f. keine Schlußfolgerungen ziehen kann.

Die absolute Katalasewirksamkeit von B. prodigiosum und M. Freudenreichii ist in den obigen Versuchen bedeutend größer als

in den früher erwähnten, was wahrscheinlich auf dem Alter der angewandten Kulturen beruht.

VIII. Einfluß der An- und Abwesenheit von Glucose in der Nährlösung auf die Katalasewirksamkeit einiger Bakterien.

In welchem Maße die Katalasewirksamkeit der Bakterien durch Zusammensetzung der Nährlösung beeinflußt wird, ist eine interessante Frage, die vielleicht Klarheit über die Bildung und Aufgabe der Katalase in den Zellen bringen kann. Wir haben vorläufig die Katalasewirkung einiger, sowohl in glucosefreier als in glucosehaltiger Nährlösung gewachsenen Bakterien bestimmt, um die Einwirkung von Zucker auf die Katalasebildung zu untersuchen.

Versuchsserie 9.

Wachstumstemperatur: Zimmertemperatur, wenn nicht anders angegeben.
Puffer: m/150 Phosphat.

B. prodigiosum.

Zeit in Minuten	4 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	5 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	14,85	—	—	17,85	—
4,7	9,35	0,0430	2,9	13,17	0,046
6,9	7,51	0,0430	5,5	9,87	0,047
9,1	6,08	0,0426	7,9	7,1	0,050
11,1	4,9	0,0434	10	5,37	0,052
13,0	4,1	0,0430	12,4	3,62	0,055
15,3	3,28	0,0428	14,5	2,5	0,059
17,7	2,6	0,0427	16,2	1,8	0,062
19,6	2,1	0,0433	18,2	1,17	0,065
	Mittel	0,0432		Mittel	0,056

Zellenzahl: 350 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,12 . 10^{-9}. — Zellenzahl: 300 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,18 . 10^{-9}.

M. Freudenreichii.

Zeit in Minuten	10 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	10 Tage alt. Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,25	—	—	22,1	—
4,0	18,53	0,0096	3,6	21,35	0,0041
7,3	17,1	0,0100	8,3	20,6	0,0037
10,3	16,0	0,0100	16,8	19,6	0,0031
12,9	15,2	0,0096	22,7	18,9	0,0030
16,2	14,1	0,0097	29,1	18,25	0,0028
19,9	13,15	0,0094	38,4	17,6	0,0026
21,8	12,7	0,0092	41,1	17,35	0,0025
24,1	12,0	0,0094			
	Mittel	0,0096		Mittel	0,0031

Zellenzahl: 19 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,51 . 10^{-9}. — Zellenzahl: 14 . 10^6 in 1 ccm. Kat. f. = 0,22 . 10^{-9}.

M. Freudenreichii.

Bei 37° gewachsen.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Bouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	20,3	—
8,9	17,65	0,0068
19,8	14,65	0,0071
26,7	13,2	0,0070
43,4	10,35	0,0067
56,3	8,55	0,0066
75,7	6,4	0,0066
	Mittel	0,0068

Zellenzahl: 18 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,38 . 10−9.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	23,4	—
3,8	22,85	0,0027
20,0	21,75	0,0016
42,5	20,8	0,0012
62,6	19,85	0,0011
87,8	19,0	0,0010
117,8	18,4	0,0009
	Mittel	0,0014

Zellenzahl: 12.5 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,11 . 10−9.

B. lactis amari.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Bouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	22,2	—
3,5	20,75	0,0083
6,9	19,6	0,0079
9,8	18,6	0,0078
12,5	17,7	0,0079
15,3	16,75	0,0080
17,9	15,92	0,0080
21,0	15,08	0,0080
	Mittel	0,0080

Zellenzahl: 41 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,20 . 10−9.

Zeit in Minuten	5 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	19,72	—
3,1	17,7	0,015
6,4	15,68	0,014
9,3	14,15	0,016
12,3	12,78	0,015
15,3	11,52	0,015
18,2	10,4	0,015
20,2	9,82	0,015
	Mittel	0,015

Zellenzahl: 56 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,27 . 10−9.

B. cremoides.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	19,25	—
3,0	15,8	0,0286
6,3	12,5	0,0297
9,1	10,4	0,0293
13,5	7,9	0,0286
17,2	6,2	0,0286
23,0	4,15	0,0290
28,0	2,95	0,0290
	Mittel	0,0290

Zellenzahl: 335 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,09 . 10−9.

Zeit in Minuten	8 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	19,12	—
3,0	18,37	0,0058
7,2	17,53	0,0052
10,1	17,0	0,0051
13,3	16,4	0,0050
15,8	16,1	0,0047
21,8	15,3	0,0044
25,4	14,7	0,0045
	Mittel	0,0050

Zellenzahl: 40 . 10⁶ in 1 ccm.
Kat. f. = 0,12 . 10−9.

B. lactis viscosum.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	5 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	17,7	—	—	15,3	—
2,5	12,9	0,0550	2,1	10,8	0,0720
4,8	9,95	0,0521	3,7	8,0	0,0761
7,7	7,35	0,0500	5,5	6,1	0,0726
10,5	4,75	0,0544	7,2	4,5	0,0738
12	3,65	0,0571	9	3,45	0,0720
17	2,55	0,0500	10,5	2,6	0,0733
20,2	1,65	0,0510	12,4	1,9	0,0730
	Mittel	0,0528		Mittel	0,0733

Zellenzahl: $280 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,19 . 10^{-9}$.

Zellenzahl: $470 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,16 . 10^{-9}$.

Bac. asterosporus.

Zeit in Minuten	15 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	8 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,85	—	—	19,15	—
17,9	17,35	0,0032	2,5	18,85	0,0027
31,5	16,65	0,0024	5,2	18,42	0,0032
40,2	16,4	0,0020	7,9	18,15	0,0030
59,3	15,75	0,0017	10,5	17,9	0,0028
70,5	15,6	0,0013	13,3	17,64	0,0027
87,7	15,0	0,0013	15,7	17,6	0,0023
			19	17,3	0,0023
			21,5	17,2	0,0021
	Mittel	0,0020		Mittel	0,0026

Zellenzahl: $18 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,11 . 10^{-9}$.

Zellenzahl: $25 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. $0,10 . 10^{-9}$.

M. aurantiacus.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	8 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	18,7	—	—	15,35	—
2,7	14,8	0,0376	2,9	11,95	0,0375
5,7	11,95	0,0341	7,6	7,9	0,0379
8,2	9,9	0,0337	10	6,32	0,0385
11,6	7,9	0,0323	12,1	5,22	0,0387
15	6,3	0,0315	14,6	4,25	0,0382
18,7	5,0	0,0306	16,6	3,45	0,0390
26	3,4	0,0290			
	Mittel	0,0327		Mittel	0,0383

Zellenzahl: $90 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,36 . 10^{-9}$.

Zellenzahl: $125 . 10^6$ in 1 ccm. Kat. f. = $0,31 . 10^{-9}$.

M. coronatus.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*	Zeit in Minuten	8 Tage alte Glucosebouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	20,55	—	—	20,26	—
2,8	18,9	0,0130	2,5	19,2	0,0093
7,6	16,1	0,0140	5,0	18,3	0,0088
12,5	13,9	0,0135	7,7	17,3	0,0089
19	11,85	0,0126	10,5	16,35	0,0088
27,2	9,45	0,0124	13,5	15,5	0,0086
34,8	7,65	0,0123	16	14,75	0,0086
46,7	5,55	0,0122	21,3	13,2	0,0087
	Mittel	0,0129		Mittel	0,0088

Zellenzahl: 92 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,14 . 10^{-9}.

Zellenzahl: 75 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. 0,12 . 10^{-9}.

M. rosettaceus.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*	Zeit in Minuten	5 Tage alte Glucosebouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	19,0	—	—	21,5	—
2,8	16,2	0,0247	2,9	20,7	0,0057
6,0	13,5	0,0247	6,0	19,9	0,0056
8,5	11,85	0,0241	8,8	19,22	0,0055
12,3	9,5	0,0244	12,5	18,4	0,0054
17,2	7,5	0,0235	15	18,0	0,0051
25,0	4,75	0,0241	18	17,3	0,0052
30,7	3,5	0,0240	20,8	16,7	0,0052
			24,1	15,92	0,0054
	Mittel	0,0242		Mittel	0,0054

Zellenzahl: 168 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,15 . 10^{-9}.

Zellenzahl: etwa 20 . 10^6 in 1 ccm. Die Größe der Zellen variierte sehr. Die Zellenzahl ist wegen der Schwierigkeiten beim Zählen nur approximativ.
Kat. f. = 0,27 . 10^{-9}.

B. Zopfii.

Zeit in Minuten	10 Tage alte Bouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*	Zeit in Minuten	10 Tage alt. Glucosebouillonkultur: n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	20,1	—	—	22,9	—
4,8	17,9	0,0104	5,9	22,2	0,0023
10,1	16,1	0,0096	10,9	22,1	0,0014
15,4	14,63	0,0090	16	21,87	0,0013
20,6	13,5	0,0084	21	21,63	0,0012
27,4	12,1	0,0080	27,4	21,47	0,0010
33,4	10,98	0,0079	33,4	21,12	0,0010
39,1	10,07	0,0076	39,4	20,9	0,0010
	Mittel	0,0087		Mittel	0,0013

Zellenzahl: 14 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,62 . 10^{-9}.

Zellenzahl: 12 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,11 . 10^{-9}.

B. Zopfii. Bei 37° gewachsen.

Zeit in Minuten	5 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	5 Tage alte Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	23,25	—	—	23,7	—
17,5	20,0	0,0037	4,5	22,8	0,0037
28,9	19,4	0,0027	15	21,7	0,0026
44,7	17,95	0,0025	25,9	20,45	0,0024
54,4	17,5	0,0023	37,5	19,6	0,0022
69,9	16,6	0,0021	52,8	18,9	0,0018
133,5	14,2	0,0016	141,7	15,7	0,0012
	Mittel	0,0025		Mittel	0,0023

Zellenzahl: 15 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,17 . 10−9. — Zellenzahl: 14,5 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,16 . 10−9.

Aus den obigen Bestimmungen geht mit genügender Deutlichkeit hervor, daß die An- oder Abwesenheit von Glucose in der Nährlösung bei der Mehrzahl der untersuchten Bakterien keine größere Änderung in der Katalasewirksamkeit hervorruft. Ein bedeutendes Sinken der Kat. f. in glucosehaltiger Nährlösung ist bei M. Freudenreichii und B. Zopfii zu beobachten. Ob die stickstoffhaltigen Nährstoffe einen größeren Einfluß auf die Bildung der Katalase ausüben, ist vorläufig nicht untersucht. Eine Stütze für die Annahme, daß die Stickstoffquelle von Bedeutung für die Katalasebildung ist, gibt jedenfalls der Befund von *Burge*[1]), der eine Vermehrung der Blutkatalase durch Eiweißkost, eine Verminderung durch Fasten festgestellt hat.

IX. Die Katalasewirksamkeit einiger Bakterien.

Versuchsserie 10. Wachstumstemperatur: Zimmertemperatur, wenn nicht anders angegeben. Puffer: m/150 Phosphat.

B. pyocyaneum. — *B. helvolum.*

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur		Zeit in Minuten	3 Tage alte 1 proz. Glucosebouillonkultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*		n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	18,8	—	—	18,7	—
2,7	14,8	0,0385	2,5	14,94	0,039
5,6	11,4	0,0388	4,9	12,5	0,035
8,3	9,35	0,0366	6,7	10,95	0,035
11,9	7,1	0,0355	8,3	9,57	0,035
14,3	6,05	0,0344	10,2	8,4	0,034
18,5	4,75	0,0323	11,9	7,3	0,034
23,5	3,5	0,0310	13,5	6,52	0,034
			15,3	5,54	0,034
	Mittel	0,0353		Mittel	0,035

Zellenzahl: 86 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,41 . 10−9. — Zellenzahl: 255 . 10⁶ in 1 ccm. Kat. f. = 0,13 . 10−9. Schlechtes Wachstum in Bouillon ohne Zucker.

[1]) *Burge*, Amer. Journ. Phys. **63**, 545, 1923; Chem. Centralbl. **1923**, I, 1516.

M. sulfureus.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	17,5	—
2,7	12,1	0,0593
5,0	8,8	0,0597
6,7	7,05	0,0590
8,5	5,5	0,0591
10,4	4,35	0,0590
12,3	3,4	0,0580
13,8	2,85	0,0570
15,6	2,18	0,0580
	Mittel	0,0586

Zellenzahl: 175 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,33 . 10^{-9}.

M. flavus.

Zeit in Minuten	9 Tage alte Bouillonkultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	14,7	—
2,3	7,5	0,127
3,7	4,9	0,129
5,4	3,08	0,126
6,8	1,95	0,129
8,6	1,3	0,122
9,8	0,85	0,126
	Mittel	0,127

Zellenzahl: 200 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,63 . 10^{-9} (approx.).

B. aërogenes I.

Zeit in Minuten	2 Tage alte Bouillonkultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	22,7	—
3,3	21,6	0,0065
6,6	20,5	0,0067
10,0	19,4	0,0067
13,9	18,1	0,0070
17,5	19,9	0,0073
20,5	15,95	0,0074
	Mittel	0,0069

Zellenzahl: 170 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,04 . 10^{-9}.

B. coli I.

Zeit in Minuten	2 Tage alte Bouillonkultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	22,7	—
4,3	20,97	0,0080
8,1	19,5	0,0081
11,6	18,15	0,0084
14,7	16,98	0,0086
17,1	16,07	0,0087
20	15,02	0,0089
23	14,08	0,0090
26,3	12,33	0,0100
	Mittel	0,0087

Zellenzahl: 260 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,034 . 10^{-9}.

B. aërogenes I.

Zeit in Minuten	4 Tage bei 37° gewachsene Kultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,27	—
4,2	18,46	0,0097
8,1	16,9	0,0097
10,5	15,83	0,0102
14,6	14,37	0,0102
17,1	13,42	0,0104
19,9	12,52	0,0105
39,8	8,5	0,0095
43,1	7,8	0,0096
	Mittel	0,0100

Zellenzahl: 255 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,039 . 10^{-9}.

B. aërogenes II.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,62	—
3,3	19,0	0,0041
6,7	18,41	0,0041
9,5	18,0	0,0040
12,6	17,5	0,0040
15,7	17,09	0,0039
18,6	16,68	0,0038
22,5	16,3	0,0036
	Mittel	0,004

Zellenzahl: 120 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,033 . 10^{-9}.

B. aërogenes III.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,43	—
4,2	20,10	0,0017
9,2	19,8	0,0015
13,0	19,41	0,0017
16,8	19,18	0,0016
20,5	18,95	0,0016
24,2	18,8	0,0015
33,5	18,2	0,0015
36,2	18,08	0,0015
	Mittel	0,0016

Zellenzahl: 90 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,017 . 10^{-9}.

B. aërogenes IV.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,24	—
3,6	19,91	0,0020
6,7	19,5	0,0024
9,5	19,22	0,0023
13,0	18,85	0,0024
16,0	18,52	0,0024
19,1	18,2	0,0024
21,6	17,92	0,0024
25	17,6	0,0024
	Mittel	0,0023

Zellenzahl: 295 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,008 . 10^{-9}.

B. coli I.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,3	—
3,8	16,28	0,0194
6,9	13,9	0,0206
9,1	12,52	0,0206
11,2	11,18	0,0211
13,4	9,82	0,0219
15,8	8,54	0,0220
18,4	7,32	0,0223
	Mittel	0,021

Zellenzahl: 540 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,038 . 10^{-9}.

B. coli II.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,72	—
4,4	20,1	0,0030
9,9	19,2	0,0033
14,6	18,6	0,0032
18,6	18,08	0,0032
22,3	17,5	0,0032
25,6	17,1	0,0032
28,3	16,8	0,0032
31,8	16,3	0,0032
	Mittel	0,0032

Zellenzahl: 170 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,019 . 10^{-9}.

B. coli III.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	19,75	—
3,0	18,4	0,0102
6,2	17,0	0,0105
9,8	15,82	0,0104
12,5	14,64	0,0104
15,5	13,68	0,0103
18,5	12,61	0,0105
21,4	11,83	0,0104
24,7	10,98	0,0103
	Mittel	0,0104

Zellenzahl: 710 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,014 . 10^{-9}.

B. coli IV.

Zeit in Minuten	4 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,6	—
3,1	20,0	0,0041
6,8	19,5	0,0035
10,1	19,0	0,0034
12,7	18,54	0,0036
15,8	18,04	0,0037
31,5	16,08	0,0034
33,5	15,9	0,0033
36	15,65	0,0033
	Mittel	0,0035

Zellenzahl: 280 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,013 . 10^{-9}.

B. coli V.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	20,48	—
3,0	19,91	0,0041
6,2	19,22	0,0044
9,8	18,62	0,0042
12,8	18,11	0,0041
16,1	17,6	0,0041
19	17,1	0,0041
22,4	16,64	0,0040
25,1	16,3	0,0040
	Mittel	0,0041

Zellenzahl: 360 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,011 . 10^{-9}.

B. coli VI.

Zeit in Minuten	2 Tage bei 37° gewachsene Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	*k*
—	19,5	—
3,6	19,2	0,0019
6,8	18,9	0,0020
9,4	18,68	0,0020
12,6	18,4	0,0020
18,8	17,92	0,0020
27,7	17,25	0,0019
36,2	16,76	0,0018
39,8	16,55	0,0018
	Mittel	0,00195

Zellenzahl: 530 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,004 . 10^{-9}.

Der Übersichtlichkeit wegen sind die Kat. f. der von uns untersuchten Bakterien in einer Tabelle angeordnet.

Bakterienart	Kat. f.	
	In zuckerfreier Bouillon gezüchtet	In Glucosebouillon gezüchtet
M. Freudenreichii . . .	0,49 . 10^{-9}	0,22 . 10^{-9}
„ aurantiacus	0,31 . 10^{-9}	0,31 . 10^{-9}
„ coronatus	0,14 . 10^{-9}	0,12 . 10^{-9}
„ rosettaceus	0,15 . 10^{-9}	0,27 . 10^{-9}
„ sulfureus	0,33 . 10^{-9}	—
„ flavus	0,63 . 10^{-9}	—
Bac. asterosporus . . .	0,11 . 10^{-9}	0,10 . 10^{-9}
B. lactis amari	0,19 . 10^{-9}	0,27 . 10^{-9}
„ prodigiosum	0,13 . 10^{-9}	0,18 . 10^{-9}
„ Zopfii	0,62 . 10^{-9}	0,11 . 10^{-9}
„ cremoides	0,09 . 10^{-9}	0,12 . 10^{-9}
„ lactis viscosum . . .	0,19 . 10^{-9}	0,16 . 10^{-9}
„ pyocyaneum	0,41 . 10^{-9}	—
„ aërogenes I	0,04 . 10^{-9}	—
„ „ II	0,03 . 10^{-9}	—
„ „ III	0,02 . 10^{-9}	—
„ „ IV	0,01 . 10^{-9}	—
„ coli I	0,04 . 10^{-9}	—
„ „ II	0,02 . 10^{-9}	—
„ „ III	0,01 . 10^{-9}	—
„ „ IV	0,01 . 10^{-9}	—
„ „ V	0,01 . 10^{-9}	—
„ „ VI	0,004 . 10^{-9}	—

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Katalasewirksamkeit der untersuchten Bakterien von derselben Größenordnung ist. Auffällig ist, daß die Kat. f. von Coli-Aerogenesbakterien, welche nach den früheren Untersuchungen ziemlich reich an Katalase sein sollen, etwa 10- bis 100mal kleiner als diejenige der anderen untersuchten Bakterien ist.

X. Einfluß der aeroben und anaeroben Züchtung auf die Katalasewirkung der Bakterien.

Die Frage nach der Katalasebildung in Abwesenheit von Sauerstoff ist theoretisch von größter Bedeutung. Nach der Auffassung von *Wieland*[1]) über die Aufgabe der Katalase in Zellen hat dieses Enzym Bedeutung hauptsächlich nur für sauerstoffbedürftige Lebewesen. In der Tat scheinen auch die streng anaeroben Bakterien außerordentlich arm an Katalase zu sein[2]).

In welcher Weise der Katalasegehalt der fakultativ anaeroben Bakterien in Abwesenheit von Sauerstoff verändert wird, haben wir mit B. prodigiosum und B. lactis amari untersucht. Unter der Annahme, daß die Katalase keine Aufgabe unter anaeroben Bedingungen hat, war es interessant zu konstatieren, ob die Katalasebildung dabei geschwächt wird. *Rywosch* und *Stapp* haben sich zwar mit derselben Frage beschäftigt und eine starke Verminderung der Katalase bei anaerober Züchtung konstatiert, ihre Bestimmungen sind aber nicht beweisend.

Bei unseren anaeroben Kulturen wurde der Luftsauerstoff mittels Pyrogallol + Kalilauge nach *Wright-Burri* entfernt. Um die Absorption von Sauerstoff in der Nährlösung zu verhindern, wurden die Röhren möglichst schnell nach dem Sterilisieren geimpft und anaerob verschlossen.

Versuchsserie 11.

Bakterien bei Zimmertemperatur gewachsen. Puffer: m/150 Phosphat.

B. prodigiosum.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	5 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	17,62	—	—	20,13	—
2,2	13,53	0,0521	2,6	17,82	0,020
4,5	10,5	0,0500	5,3	15,65	0,020
6,7	8,08	0,0505	8,2	13,8	0,020
9,0	6,2	0,0504	11,4	11,96	0,020
11,3	4,54	0,0530	14,4	10,48	0,020
13,6	3,42	0,0523	17,2	9,15	0,020
16,0	2,46	0,0534	20,3	7,91	0,020
19,8	1,5	0,0540	24,6	6,42	0,020
22,4	1,04	0,0540	28,2	5,4	0,020
24,8	0,88	0,0530			
	Mittel	0,0523		Mittel	0,020
Zellenzahl: 130 . 10^6 in 1 ccm.			Zellenzahl: 80 . 10^6 in 1 ccm.		
Kat. f. = 0,40 . 10^{-9}.			Kat. f. = 0,25 . 10^{-9}.		

[1]) *Wieland*, Chem. Ber. 54, 2373, 1921.

[2]) *Lesser*, Zeitschr. f. Biol. 48, 1, 1906; *D.* u. *M. Rywosch*, l. c.; *Jorns*, l. c.

Zeit in Minuten	8 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	16,28	—
3,9	11,72	0,0366
16,8	4,35	0,0341
	Mittel	0,0353

Zellenzahl: 60 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,59 . 10^{-9}.
(Kat. f. bei aërober Züchtung 0,13 . 10^{-9}).

B. lactis amari.

Zeit in Minuten	3 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	5 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	18,77	—	—	19,7	—
2,3	12,7	0,0737	2,7	16,6	0,0275
4,5	9,04	0,0705	5,5	14,15	0,0260
6,0	7,2	0,0700	8,0	12,2	0,0260
7,7	5,57	0,0685	10,7	10,35	0,0260
9,6	4,08	0,0690	13,7	8,72	0,0258
11,6	3,0	0,0686	16,7	7,3	0,0258
13,7	2,25	0,0670	20,0	5,96	0,0259
15,6	1,67	0,0673	23,0	4,9	0,0262
17,7	1,26	0,0664	27,2	3,72	0,0266
19,8	0,9	0,0666			
	Mittel	0,0687		Mittel	0,0262

Zellenzahl: 135 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,51 . 10^{-9}.

Zellenzahl: 65 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0.40 . 10^{-9}.

Zeit in Minuten	10 Tage alte Kultur		Zeit in Minuten	10 Tage alte Kultur	
	n/40 $KMnO_4$ ccm	k		n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	20,38	—	12,0	10,5	0,0240
2,7	17,46	0,0248	16,9	7,85	0,0245
5,7	14,9	0,0240	21,1	6,15	0,0247
8,5	12,82	0,0237			

Mittel 0,0243
Zellenzahl: 60 . 10^6 in 1 ccm.
Kat. f. = 0,41 . 10^{-9}.
(Kat. f. bei aerober Züchtung 0,19 . 10^{-9}).

Die Versuche zeigen übereinstimmend, daß die Katalasewirksamkeit der unter anaeroben Bedingungen gewachsenen Bakterien bedeutend größer ist als diejenige der aerob gewachsenen. Dieser Befund, der in vollem Widerspruch mit der Annahme von anderen Forschern steht, ist in mancher Hinsicht interessant. Auf Grund unserer Resultate

scheint die Annahme nicht unberechtigt, daß die Katalase auch unter anaeroben Bedingungen von großer Bedeutung für die Zellen ist. Ein Beweis für diese Annahme ist der Befund jedoch nicht. Man kann sich den Vorgang auch so vorstellen, daß die fakultativ anaeroben Bakterien in Abwesenheit von Sauerstoff fortdauernd die jetzt unnötige Katalase bilden und daß die Katalasewirksamkeit dadurch erhöht wird, daß die Katalase nicht mehr durch das in den Zellen gebildete Wasserstoffsuperoxyd inaktiviert wird. Interessant wäre es, den Katalasegehalt der fakultativen Anaerobier längere Zeit bei anaerober Züchtung zu verfolgen.

XI. Löslichkeit der Bakterienkatalase in Wasser.

Nach *Jorns* (l. c.) gibt es in Bakterien eine im Wasser lösliche und eine in Wasser unlösliche Katalase, die er Ekto- und Endokatalase nennt. In jüngeren Kulturen ist nur Endokatalase vorhanden, in älteren dagegen auch bedeutende Mengen Ektokatalase.

Auch nach unseren Bestimmungen geht aus den älteren Kulturen bedeutend mehr Katalase in die bakterienfreien Filtrate als aus den jüngeren, das beruht aber nach unserer Meinung nicht auf der Verschiedenheit der Katalase in den Bakterien, sondern ist auf die teilweise Autolyse der Zellen zurückzuführen. Wir führen einige von unseren Bestimmungen an.

Versuchsserie 12.

B. prodigiosum.

1. 3 Tage bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur.

20 cm der Kultur wurden zentrifugiert, in 50 ccm m/150 Phosphatlösung gebracht und 2 Stunden bei 0° kräftig geschüttelt. Darauf wurde durch ein *Pukal*sches Filter filtriert und bei 0° die Katalasebestimmung ausgeführt.

Zeit in Minuten	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	25,45	—
4,3	24,7	0,0030
21,6	23,7	0,0018
46,3	22,3	0,0012
79,6	20,9	0,0011
113,8	19,4	0,0010
115,0	18,1	0,0009
	Mittel	0,0015

2. 47 Tage bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur.

10 cm der Kultur wurden in 40 cm m/150 Phosphatlösung gebracht und bei 0° 2 Std. geschüttelt, worauf durch ein *Pukal*sches Filter filtriert wurde. 10 ccm des keimfreien Filtrats wurden in 40 ccm m/150 Phosphatlösung gebracht. Mit dieser Lösung wurde die Katalasebestimmung bei 0° ausgeführt.

Zeit in Minuten	n/40 $KMnO_4$ ccm	k
—	22,0	—
2,8	19,9	0,0155
5,4	18,7	0,0130
12,7	15,7	0,0110
19,4	13,4	0,0110
28,7	11,1	0,0104
42,0	7,85	0,0106
63,6	4,7	0,0105
71,5	3,6	0,0110
	Mittel	0,0116

3. 3 Tage bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur.

Es wurde genau auf dieselbe Weise wie im Versuch 1 verfahren, das keimfreie Filtrat wurde nur bis zum Sieden erhitzt.

Zeit in Minuten	n/40 $KMnO_4$ ccm	Zeit in Minuten	n/40 $KMnO_4$ ccm
—	26,0	30,0	25,9
2,5	25,9	146,0	25,8

Bei den obigen Versuchen wurde die Bakterienzahl nicht bestimmt, so daß die Versuche 1 und 2 miteinander nicht vergleichbar sind. Ohne Zweifel ist jedoch aus der 47 Tage alten Kultur viel mehr Katalase in die wässerige Lösung gegangen als aus der 3 Tage alten Kultur.

Zusammenfassung.

Es wurde durch eine Reihe von Bestimmungen mit mehreren Bakterien konstatiert:

1. daß die Wasserstoffsuperoxydspaltung durch Bakterien nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen verläuft,

2. daß die Reaktionskonstanten proportional mit der Zellenzahl wachsen,

3. daß die Reaktionskonstante unabhängig von der Substratkonzentration ist.

Die Katalasewirksamkeit der Bakterien ist daher durch den Quotienten:

$$\text{Kat. f.} = \frac{\text{Reaktionskonstante } k}{\text{Zellenzahl}}$$

zu charakterisieren.

Für eine Reihe verschiedener Bakterien ist die Kat. f. bestimmt worden (s. Tabelle auf S. 41).

Unsere Versuche haben gezeigt, daß die Kat. f. als ein Maß des Katalasegehaltes der Bakterien anzusehen ist. Dieselbe Zellenzahl ein und derselben unter gleichen Bedingungen gewachsenen Bakterien gibt die gleiche Katalasewirkung. Durch Trocknung, Erwärmung oder durch Protoplasmagifte wird der Quotient nicht erhöht.

Die Einwirkung des Alters, der Wachstumstemperatur und der An- oder Abwesenheit von Glucose und Sauerstoff in der Nährlösung auf die Katalasewirksamkeit der Bakterien wurde mit einigen Bakterien untersucht.

Es wurde unter anderem gefunden, daß B. prodigiosum und B. lactis amari unter anaeroben Bedingungen eine höhere Katalasewirksamkeit als bei aerober Züchtung zeigen.

Die Katalase in Bakterien ist in der Regel nicht besonders empfindlich gegen H_2O_2 und Phosphat. Bei mehreren Bakterien wurde noch eine ziemlich gute Konstante bei n/10 H_2O_2 und m/15 Phosphat erhalten.

Die Katalase wird durch verschiedene Einflüsse bei verschiedenen Bakterien nicht in gleichem Maße inaktiviert.

Die Katalase der lebenden Bakterien geht nur in minimaler Menge in die wässerige Lösung über. Die Filtrate von älteren Kulturen enthalten wegen der Autolyse der Zellen bedeutend mehr Katalase.

Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und Ionendurchlässigkeit von Membranen.

IV. Mitteilung:

Potentialdifferenzen und Permeabilität von Kollodiummembranen.

Von

Leonor Michaelis und Akiji Fujita.

(Aus dem biochemischen Institut der Aichi-medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 13. April 1925.)

1. Die ausgetrocknete Kollodiummembran.

Die in der vorangegangenen Mitteilung beschriebene Versuchsanordnung zur Messung der Potentialdifferenzen[1]) wurde nunmehr für Kollodiummembranen angewendet. In der ersten Versuchsreihe stellten wir Membranen von der Beschaffenheit her, wie sie gewöhnlich für die Dialyse benutzt werden. Zylindrische Glasgefäße wurden mit 4 proz. Kollodiumlösung in Alkohol + Äther ausgegossen und die Kollodiumhaut vom Glase abgelöst, sobald die Trocknung es eben erlaubte, an der Luft ein wenig weiter getrocknet (bei sehr tiefer Zimmertemperatur $^1/_2$ bis 1 Stunde) und dann sofort mit Wasser benetzt. Solche Hülsen sind bekanntlich für alle nicht kolloidalen Stoffe gut durchgängig. Die Potentialdifferenz mit solchen Hülsen war ähnlich mit der des Pergamentpapiers, nur waren die Ausschläge kleiner. Wenn die Hülsen mit zwei verschieden konzentrierten Lösungen in Berührung waren, so zeigte sich eine Potentialdifferenz, welche etwas verschieden war von der bei freier Diffusion und in dem Sinne gedeutet werden konnte, daß die Beweglichkeit des Anions relativ zu der des Kations herabgesetzt war. Die Abweichungen des Potentials von dem bei freier Diffusion waren aber gering und offenbar in starkem Maße von der Herstellungsart der Hülse abhängig. Viel interessanter waren die Resultate mit stärker ausgetrockneten Kollodiumhülsen. Die auf übliche Weise hergestellten Hülsen wurden, ohne vorläufig mit Wasser benetzt zu werden, an der freien Luft vollkommen ausgetrocknet. Bei Zimmertemperatur im Winter scheint der Zustand nach einem Tage definitiv zu sein, man kann aber auch mehrere

---

[1]) *A. Fujita*, diese Zeitschr. 159, 370, 1925.

Tage lang trocknen lassen. Dabei schrumpfen die Hülsen bedeutend ein. Die Hülsen wurden in der Regel der Stabilität wegen etwas dicker hergestellt, als man sie für Dialysezwecke braucht, jedoch hängen die Resultate davon nicht ab. Bei feuchtem Wetter muß man besonders darauf achten, daß im Anfangsstadium des Trocknens sich keine Wassertröpfchen an der Hülse bilden. Diese Hülsen haben völlig andere Eigenschaften als die schwach getrockneten. Bei oberflächlicher Beobachtung erscheinen sie undurchlässig für Wasser und gelöste Substanzen. Wenn man eine HCl- oder NaCl-Lösung durch eine solche Hülse von destilliertem Wasser trennt, so bemerkt man auch nach Tagen keinen Übertritt von Wasser in das HCl oder von HCl in das Wasser. Die elektromotorischen Effekte dieser Membranen sind sehr auffällig und sollen zunächst beschrieben werden. Die Messungen wurden in Abständen von 5 Minuten ausgeführt, bis drei solcher Ablesungen konstant blieben, und das ist in den meisten Fällen innerhalb 15 Minuten erreicht, bei manchen Fällen aber zeigten sie auch nach einer Stunde keine Neigung, konstant zu werden. Solche Fälle werden in den folgenden Protokollen mit ihrem Anfangswert und dem Zeichen ↑ (Neigung zum Steigen) oder ↓ (Neigung zum Fallen) bezeichnet.

Jede Hülse wurde nach der Benutzung über Nacht in fließendem Wasser gewaschen und einige Zeit in destilliertes Wasser gelegt. Danach kann sie wie eine frische Hülse wieder benutzt werden. Jede Zahl in den folgenden Tabellen bedeutet das definitive Potential eines selbständigen Versuchs mit je einer Hülse. Das Vorzeichen bezieht sich auf die verdünntere Lösung, das positive Vorzeichen ist fortgelassen.

2. Konzentrationsketten.

Tabelle I.

Art der Elektrolyte	Konzentrationen der beiden Lösungen in Normalität	EMK in Millivolt	Mittel
	1. Säuren.		
HCl	0,1 : 0,01	54,3, 53, 54, 58	54,8
HCl	0,1 : 0,001	108	108
Pikrinsäure	gesättigt : $^1/_{10}$ gesättigt	48—52, 48—57	51
	2. Salze mit dem gemeinsamen einwertigen Kation K˙ und a) einwertigen Anionen (einschließlich KOH und NaOH):		
KCl	1,0 : 0,1	31, 36	33,5
KCl	0,1 : 0,01	46, 43, 43, 49, 56, 42, 48,3	46,7
KCl	0,1 : 0,001	96,5 ↑, 103	99,7
KCl	0,01 : 0,001	48	48
KJ	0,1 : 0,01	47, 48	47,5
KBr	0,1 : 0,01	40, 49,5	44,7
KNO_3	0,1 : 0,01	47, 43	45
KOH	0,1 : 0,01	45, 34, 36, 38	38,2
NaOH	0,1 : 0,01	30 ↓, 37,5, 33, 36 ↓, 32	33,7

Tabelle I (Fortsetzung).

Art der Elektrolyte	Konzentrationen der beiden Lösungen in Normalität	EMK in Millivolt	Mittel
	b) zweiwertigen Anionen:		
K_2SO_4	0,1 : 0,01	47, 49, 35	43,6
K_2CO_3	0,1 : 0,01	47, 49	48
$K_2C_2O_4$ . . .	0,1 : 0,01	52, 43	47,5
	c) dreiwertigem Anion:		
K_3FeCy_6 . . .	0,1 : 0,01	50, 48	49
	3. Salze mit dem gemeinsamen einwertigen Anion Cl′ und		
	a) einwertigen Kationen:		
LiCl	0,1 : 0,01	54 ↑, 52, 55 ↑	53,6
RbCl	0,1 : 0,01	49, 48	48,5
	b) zweiwertigen Kationen:		
$CaCl_2$	0,1 : 0,01	13 ↑, 23 ↑, 47, 38, 19 ↑, -24	
$MgCl_2$	0,1 : 0,01	21, —10, 12, —10	
$BaCl_2$	0,1 : 0,01	16 ↑, —9, 12 ↑, 40 ↑	
	c) dreiwertigen Kationen:		
$AlCl_3$	0,1 : 0,01	26 ↑, 22, 20,5	22,8
$CeCl_3$	0,1 : 0,01	28 ↑, 20 ↑, 24	24

Überblicken wir diese Resultate, so ist zunächst die Größe der Potentialdifferenzen auffällig. Konzentrationsketten mit HCl geben den vollen Maximaleffekt einer für H-Ionen reversiblen Kette, nämlich für jede Zehnerpotenz des Konzentrationsverhältnisses fast 57 Millivolt. Dasselbe gilt für die Konzentrationskette mit Pikrinsäure. Was die Natur dieser Säure betrifft, so ist es schon lange bekannt, daß sie eine sehr starke Säure ist. Die verschiedenen Versuche, ihre Dissoziationskonstante zu bestimmen, führten je nach den Bedingungen und der Methode zu verschiedenen aber immer sehr großen Werten. In einer unter Leitung von *Michaelis* ausgeführten Untersuchung hat *Gräger*[1] gezeigt, daß Konzentrationsketten mit Pikrinsäurelösungen und Chinhydronelektroden nach *Bijlmann* und nach *Sörensen* eine EMK haben, welche nur etwa 1 bis 2 Millivolt kleiner ist als die einer HCl-Konzentrationskette. Inzwischen ist sie von *Halban* und *Ebert*[2]) noch genauer untersucht worden. Nach diesen Untersuchungen dürfen wir heute die Pikrinsäure als eine starke, unter fast allen Umständen beinahe vollkommen dissoziierte Säure auffassen, wobei nur der Aktivitätsfaktor der Pikrationen unter gleichen Konzentrationsbedingungen etwas anders ist als bei HCl. In Übereinstimmung hiermit gibt auch die Konzentrationskette mit Pikrinsäure an der Kollodiummembran

[1]) *Gräger*, Dissertation, Berlin 1923.
[2]) *Halban* und *Ebert*, Zeitschr. f. physik. Chem. **112**, 359, 1924.

praktisch dieselbe EMK wie die HCl-Kette. Die Pikrinsäurekette ist ein sehr anschauliches Beispiel, um die später zu besprechende Theorie dieser Kette zu erläutern. Man kann nämlich durch Diffusionsversuche zeigen, daß die Kollodiummembran für Pikrationen absolut undurchlässig ist. Diese Anionenundurchlässigkeit kann für die stark gefärbten Pikrationen viel müheloser nachgewiesen werden als für die gewöhnlichen Anionen. Auch färbt sich die Substanz der Hülse mit der Pikrinsäure nicht an.

Die Ketten mit den Salzen lassen zunächst erkennen, daß die Natur des Anions völlig belanglos ist. Nur die Konzentrationsketten mit KOH und NaOH haben oft eine etwas geringere EMK, bis herab zu 30 statt etwa 50 Millivolt. Ist das Kation einwertig, so beträgt die EMK für ein Konzentrationsverhältnis 1 : 10 bei Anwendung eines ganz beliebigen Salzes in der Regel zwischen 40 bis 52 Millivolt. Die Natur und die Wertigkeit des Anions hat keinen Einfluß darauf. Die Werte sind etwas individuell für die verschiedenen Hülsen. Die Konstanz der Werte ist meist innerhalb von 2 bis 3 Millivolt gut, in anderen Fällen ein wenig schlechter. Die EMK der Kette mit LiCl ist mit der Zeit etwas veränderlich und erreicht oft lange Zeit keinen konstanten Wert. Dasselbe gilt auch bisweilen für NaOH, während es bei KOH nicht der Fall ist. In allen Fällen ist die verdünntere Lösung positiv gegen die konzentriertere.

Die Ketten mit zweiwertigen Kationen sind viel schlechter reproduzierbar. Sie schwanken so sehr, daß gelegentlich eine Umkehr des Vorzeichens eintritt, und bei ihnen wird die EMK oft lange Zeit nicht konstant. Bei den dreiwertigen Kationen ist die EMK besser reproduzierbar, ist aber kleiner als bei einwertigen. Sie zeigen aber oft bedeutende zeitliche Schwankung.

Zur besseren Beurteilung dieser Resultate ist es wünschenswert, einige Ketten mit symmetrischer Anordnung zu messen, bei denen kein Potentialunterschied zu erwarten ist. Solche Versuche ergaben sich in der Tabelle II. Wie man sieht, ist der theoretisch zu erwartende Wert 0 selten in vollkommener Weise realisiert. Potentialdifferenzen von 2 bis 3 Millivolt, ja sogar bis zu 7 Millivolt kommen vor. Da die Flüssigkeiten dieser Kette ganz symmetrisch sind, kann die Ursache der EMK nur auf irgend einen von selbst verlaufenden Prozeß in der Kollodiummembran zurückgeführt werden. Dieser mag vielleicht in einer durch die Elastizität hervorgerufenen Veränderung der Struktur bestehen, welche an der konvexen und der konkaven Seite der Hülse in verschiedener Weise geschieht. Jedenfalls zeigen uns diese Versuche an, daß auf alle Fälle bei solchen Ketten mit Kollodium eine irgendwelcher theoretischen Behandlung nicht zugängliche Unsicherheit von einigen Millivolt bestehen bleibt. Diese Unsicherheit ist aber sehr klein gegen-

über der gesamten EMK in den Ketten mit unsymmetrischer Anordnung. Jedenfalls hindert dieser Umstand, daß die aus der Semipermeabilitätstheorie berechneten elektromotorischen Effekte bei unsymmetrischen Anordnungen aufs Millivolt genau durch das Experiment bestätigt werden. Aber derartige Fälle, daß ein Potential innerhalb einiger Millivolt unsicher ist, gibt es selbst bei metallischen Elektroden sehr viel, und man wird deshalb nicht die allgemeine Theorie für solche Fälle verwerfen, sondern die Ursachen für die kleinen Abweichungen besonders zu erforschen haben.

Tabelle II.

Salze	Konzentration in Normalität in den beiderseitigen Lösungen	EMK in Millivolt	Mittel
KCl . . . {	0,1	0,3, 5, 6, 0,5	2,9
	0,1	2, 7, 0 ↑, 3,5 ↑, — 1, — 1, + 1	1,6
HCl	0,1	1,4 ↓, 0 ↑, 1,2, 3,5, 0,5	1,7

8. Ketten mit verschiedenen Salzen bei gleicher Konzentration.

Eine zweite Versuchsreihe stellt die Potentialdifferenzen zwischen zwei Lösungen verschiedener Elektrolyte bei gleichen Äquivalentkonzentrationen fest. Auch hier ergaben sich in der Regel große EMK, wenn das Kation beider Elektrolyte verschieden war. Bei gemeinschaftlichem Kation dagegen ist die EMK stets innerhalb der soeben diskutierten Fehlerquellen = 0, welches auch das Kation sei, und unabhängig davon, ob das Anion gemeinschaftlich ist oder nicht. Die Anionen sind völlig belanglos. Ketten mit KCl und KJ, KCl und $^1/_2$ K_2-Oxalat, KCl und $^1/_3$ K_3-Ferricyanid geben eine EMK praktisch = 0, und sogar das OH-Ion verhält sich kaum anders. Ketten mit KCl und KOH ergeben bei 0,1 n Konzentration Werte zwischen 4 und 13 Millivolt, bei 0,01 n Konzentration sind sie praktisch = 0. Die Ketten mit NaCl und NaOH geben bei 0,1 n Konzentration 7 bis 15 Millivolt, bei 0,01 n Konzentration 10 bis 19 Millivolt. Die OH-Ionen sind daher die einzigen Anionen, von denen man nicht mit voller Sicherheit behaupten kann, daß sie unter allen Bedingungen für die Größe der EMK einer Kette wirklich ganz belanglos sind. Auf alle Fälle ist der Einfluß der OH-Ionen aber sehr gering.

Man beachte die Verschiedenheit dieses Verhaltens der Kollodiummembran gegenüber dem einer H_2-Elektrode; man erkennt, daß die Kollodiumkette auch nicht in gröbster Annäherung als eine nur für H-Ionen reversible Kette betrachtet werden kann, wie etwa die Gaskette von *Cremer* und *Haber*.

Tabelle III.

Ketten mit verschiedenen Salzlösungen bei gleicher Konzentration. Die nicht eingeklammerten Zahlen geben die EMK in Millivolt für die Konzentration 0,1 n in beiden Lösungen, die eingeklammerten für 0,01 n in beiden Lösungen. Das Vorzeichen bezieht sich auf die zu zweitgenannte Salzlösung.

Art der Kette	EMK in Millivolt	Mittel
1. Ketten mit gemeinschaftlichem Anion.		
KCl gegen NaCl	51, 45 (49, 42)	48 (45,5)
NH_4Cl	— 5, — 7, — 7	— 6,3
LiCl	71, 75, 75 (42, 53 ↓, 81)	73,6 (58,6)
RbCl	— 10, — 7 (— 11)	— 8,5 (— 11)
$CaCl_2$	94, 81, 95 (97)	90 (97)
$MgCl_2$	137, 122, 125	128
$BaCl_2$	82,5, 101,5, 76,5	86,8
$AlCl_3$	37, 39,7 52	42,9
$CeCl_3$	78,5 85,5	
HCl	— 84, — 94, — 100 (— 88, — 91 ↑)	— 92,6 (— 89,5)
HCl gegen NaCl	141, 140 (120 ↓, 137 ↓, 114 ↓, 128 ↓)	140,5 (124,7)
LiCl	162, 167 (125 ↓, 125 ↓)	164,5 (125)
RbCl	90, 84	87
LiCl gegen NaCl	— 33, — 45, — 41 (22 ↓ — 18 ↓, — 38)	— 39,6 (— 11,3)
2. Ketten mit gemeinschaftlichem Kation.		
KCl gegen KBr	— 4,5, 0	— 2,2
KJ	0,3, — 0,8 (— 4 ↑, — 2)	— 0,2 (— 3)
KNO_3	5, 2	3,5
K_2SO_4	— 3,5, — 1,5 (— 6 ↓)	— 2,5 (— 6)
K_2CO_3	— 5,5, — 4,8	— 5,1
$K_2C_2O_4$	— 3,5, 3,5	0
K_3FeCy_6	— 1,5, — 3,5	— 2,5
KOH	13,5, 5,0, 16,5, 4,0, 7,5, 13 (— 3, 0,3, 3, — 0,2, 7,5, 1,5, — 0,5, — 1,5)	9,9 (0,9)
NaCl gegen NaOH	7,5, 14,3, 15,3 (17, 16, 20, 8, 18, 14, 10,5, 19,5)	12,3 (15,3)
3. Ketten mit H˙ und OH′.		
HCl gegen KOH	114,5, 113, 118	115,1
NaOH	159, 157, 99, 78, 121	122,8
4. Ketten mit Salzen der Alkaloidbasen (in 0,01 äquivalentnormaler Konzentration).		
KCl gegen Strychninsulfat	35, 35	35
Chininhydrochlorat	47, 48	47,5
Pilocarpinhydrochlorat	23, 29	26
Atropinsulfat	44, 35	39,5

Die Deutung aller dieser Befunde kann darin gefunden werden, daß die Beweglichkeit der Anionen noch stärker herabgesetzt ist als in der Pergamentmembran. Die Befunde haben eine auffällige Ähnlichkeit mit denen an der Apfelschale, und zweifellos würde eine vollkommene

Deutung der Kollodiumversuche auch für die Apfelschale zutreffen und an die Stelle der von *Beutner* empfohlenen Phasengrenztheorie treten müssen. Die Konzentrationsketten mit HCl ergeben eine so hohe EMK, daß die Permeabilität für Cl-Ionen im Vergleich zu der der H-Ionen praktisch = 0 angesehen werden kann. Die Konzentrationsketten mit Neutralsalzen ergeben meist etwas kleinere Werte als die theoretischen Maximaleffekte. Man hat hier zunächst die Wahl, ob man auch hier die Anionen für völlig impermeabel halten und das Defizit der EMK auf eine besondere, noch weiter zu untersuchende Ursache zurückführen will, oder ob man die relative Beweglichkeit der Anionen hier etwas größer annehmen will. Auf den ersten Blick möchte man zu der letzteren Entscheidung neigen, jedoch ist ein Umstand vorhanden, welcher sie zweifelhaft macht. Die EMK ist nämlich für alle Neutralsalze mit einwertigem Kation praktisch gleich. Wenn die Anionen überhaupt eine Rolle spielten, so müßten doch wenigstens die ein- und mehrwertigen Anionen einen Unterschied ergeben. Das ist aber nicht der Fall. Auch müßte sich ein Unterschied in der Beweglichkeit der Anionen untereinander doch zeigen, wenn man Ketten mit gemeinschaftlichem Kation und verschiedenen Anionen mißt. Diese jedoch geben mit jedem beliebigen Paare von Anionen alle praktisch den Wert 0, selbst die Kette KCl und K_3-Ferricyanid; sogar die Kette KCl gegen KOH zeigt mit der kurz vorher besprochenen Einschränkung dasselbe Verhalten. Wir dürfen daraus schließen, daß im Vergleich zu den Kationen alle Anionen praktisch als impermeabel angesehen werden müssen. Es ist ja auch durchaus nicht bewiesen, daß eine Konzentrationskette mit einem Neutralsalz bei dieser Anordnung selbst bei völliger Impermeabilität des Anions genau denselben Effekt geben müßte wie eine Konzentrationskette, welche für diese Ketten reversible metallische Elektroden enthält. Die strenge theoretische Bearbeitung dieser Frage soll auf eine spätere Zeit verschoben werden.

Die Ketten mit zwei verschiedenen Salzen in gleicher Konzentration (Tabelle III. 1). gestatten uns, die relative Beweglichkeit der verschiedenen Kationen zu messen, wenn wir annehmen, daß die Beweglichkeit der Anionen auf alle Fälle sehr klein ist gegenüber der der Kationen. Wenn z. B. bei der Kette HCl/KCl die KCl-Lösung um über 90 Millivolt positiver ist als die HCl-Lösung, so zeigt das an, daß die H-Ionen ein Bestreben haben, viel schneller in die Membran einzudringen als die K-Ionen. Die Größe des Potentialunterschieds kann als ein Maß für den Unterschied der Beweglichkeiten der Kationen in der Membran betrachtet werden. Wenn wir die Potentialdifferenz aller Salze gegen einen gemeinsamen Standard, nämlich KCl, vergleichen, so finden wir für die Beweglichkeit der einwertigen Kationen folgende Reihe:

Potentialdifferenz von KCl gegen:

HCl	92,6
RbCl.	8,5
NH_4Cl	6,3
NaCl	— 48
LiCl	— 73,6

Die genauere theoretische Verarbeitung dieser Zahlen möchten wir auf eine spätere Arbeit verschieben und jetzt nur auf folgendes aufmerksam machen. Wenn die Kette HCl/KCl die sehr große EMK von 92 Millivolt gibt, so bedeutet das, daß im Vergleich zu den H-Ionen die K-Ionen schon beinahe undurchlässig sind. Wenn die Kette KCl/LiCl die EMK — 73 Millivolt hat, so bedeutet das, daß im Vergleich zu den K-Ionen die Li-Ionen praktisch beinahe impermeabel sind. So finden wir also innerhalb der Kationen viel stärkere Unterschiede in der Beweglichkeit innerhalb der Membran als bei der freien Diffusion. Wenn wir fernerhin aus der vorher beschriebenen Konzentrationskette mit LiCl 0,1 : 0,01 eine EMK von über 50 Millivolt finden, so folgt daraus wieder, daß im Vergleich zu den Li-Ionen die Cl-Ionen praktisch unbeweglich sind. So finden sich innerhalb der Kationen ganz außerordentliche Unterschiede in der Beweglichkeit innerhalb der Membran, und doch ist das am wenigsten bewegliche Kation Li immer noch sehr viel besser beweglich als irgend ein Anion. Eine theoretische Erörterung über die mehrwertigen Kationen wollen wir in dieser Mitteilung noch nicht geben. Sie soll in einer besonderen Arbeit geschehen.

Wir haben auch einige der toxischen Alkaloide in den Bereich der Untersuchungen bezogen. Es zeigt sich nichts besonders Auffälliges bei diesen Kationen, ihre Beweglichkeit in der Membran ist scheinbar von der Größenordnung der des Natriums (Tabelle III, 4).

Die Veränderung des Kollodiums durch das starke Trocknen ist zweifellos auf eine Verengerung der Porenweite zurückzuführen. Solange die Poren noch größer sind, ist die Hemmung der Anionenbewegung noch klein, und mit fortschreitender Austrocknung werden sie immer undurchgängiger. Das völlig ausgetrocknete Kollodium darf als praktisch undurchgängig für beliebige Anionen, aber durchgängig für alle einfachen Kationenarten betrachtet werden. Es ist somit ein vollkommenes Modell für die Apfelschale, und in gewissem Sinne auch für die Membran der Blutkörperchen, nur daß diese umgekehrt, für Anionen durchdängig, für Kationen undurchgängig ist.

4. Einige Versuche mit Salzkombinationen.

Einige Versuche wurden mit Ketten von Salzgemischen gemacht, in der Weise, daß die beiden Lösungen alle Elektrolytarten gemeinschaftlich, wenn auch in verschiedener relativer Konzentration, enthielten.

Wir erwarteten, daß derartige Ketten bei der späteren theoretischen Bearbeitung des Materials von besonderem Nutzen sein würden und geben hier zunächst nur die Resultate. Für diese Ketten ist auffällig, daß das Potential besonders gut konstant bleibt. In der ersten Versuchsreihe sind verschiedene Chloride miteinander kombiniert. Betrachten wir z. B. die Ketten mit KCl- und NaCl-Gemischen, so bemerken wir, daß das Vorzeichen des Potentials, ja sogar die Größe desselben beinahe allein durch die Konzentration des $K^{\cdot}$ bestimmt wird, während das Na fast belanglos ist. Andererseits wird bei Kombinationen von HCl mit Salzen das Potential fast allein durch die H-Ionen bestimmt. Im allgemeinen hat also das schneller bewegliche Ion den überwiegenden Einfluß auf den Sinn und die Größe des Potentials.

In einer anderen Versuchsreihe wurde eine Konzentrationskette von NH_4Cl, 0,1 und 0,01 n untersucht, wobei jedesmal eine bestimmte Menge NH_3 zugefügt wurde, so daß das p_H in beiden Lösungen stets gleich, in verschiedenen Versuchen aber verschieden war. Auf alle Fälle aber war die Konzentration der Ionen des Wassers verschwindend klein gegenüber der Konzentration der Salzionen. Ein sicherer Einfluß des p_H zeigt sich nicht, die Unterschiede sind nicht größer als sie in gewöhnlichen Konzentrationsketten mit verschiedenen Proben von Kollodiumhülsen sind.

Tabelle IV.

Art der Kette	EMK in Millivolt		Mittel
0,1 n KCl + 0,01 n NaCl/0,01 n KCl + 0,1 n NaCl .	34		34
0,1 n KCl/0,01 n KCl + 0,1 n NaCl	32		32
0,1 n KCl + 0,01 n NaCl/0,01 n KCl	51		51
0,1 n LiCl + 0.01 n HCl/0,01 n HCl	7		7
0,1 n NaCl + 0,01 n HCl/0,01 n HCl	4		4
0,1 n KCl + 0,01 n HCl/0,01 n HCl	2,5		2,5
	Membran A	Membran B	
0,1 n NH_4Cl/0,01 n NH_4Cl	52,5	39,5	46,0
0,1 n NH_4Cl + 0,1 n NH_3/0,01 n NH_4Cl + 0,01 n NH_3	52,5	40,5	46,5
0,1 n NH_4Cl + 0,5 n NH_3/0,01 n NH_4Cl + 0,05 n NH_3	42,0	36,5	39,2
0,1 n NH_4Cl + 0,9 n NH_3/0,01 n NH_4Cl + 0,09 n NH_3	40,0	37,0	38,5

5. Diffusionsversuche.

1. Wenn man 0,1 n HCl-Lösung oder 0,1 n KCl-Lösung durch eine stark getrocknete Kollodiummembran von reinem Wasser trennt, so findet sich auch nach einer Woche in dem destilliertem Wasser weder eine Spur von HCl noch von KCl (Tabelle V, Versuch 1 und 2 C. Bei den Versuchen mit HCl tritt nur in einigen Fällen nach länger als einer Woche im destillierten Wasser eine ganz minimale Säuerung ein, welche soeben gerade durch eine leichte Orange-Verfärbung des Methylorange erkannt werden kann. Eine einwandfreie Cl-Reaktion

wurde selbst nach 24 Tagen in dem Wasser nicht festgestellt. Bei den Versuchen mit KCl konnte nach 25 Tagen im Wasser weder K noch Cl gefunden werden.

2. Wenn man eine 0,1 n HCl-Lösung durch die Membran von einer 0,1 n KCl-Lösung trennt, so tritt von Tag zu Tag sichtbar fortschreitend ein Austausch der H- und K-Ionen in den Lösungen ein (Tabelle V, Versuch 1 A). Schon am zweiten Tage beginnt die Reaktion in der KCl-Lösung deutlich sauer gegen Methylorange zu werden, und als der Versuch am 24. Tage abgebrochen wurde, konnte in der HCl-Lösung deutlich K nachgewiesen werden.

3. Wenn man 0,1 n KCl-Lösung gegen 0,1 n NaCl-Lösung durch Kollodium diffundieren läßt, so tritt sehr langsam ein Austausch der Kationen ein. Am zweiten Tage findet sich übereinstimmend in allen Versuchen noch kein K in dem NaCl, wohl aber am elften Tage (Tabelle V, Versuch 5).

4. Wenn man 0,1 n KCl-Lösung gegen 0,1 n KNO_3- oder K_2SO_4-Lösung diffundieren läßt, so ist in der Regel (bei vier Versuchen dreimal) bis nach 3 Wochen kein Cl in der Nitrat- oder Sulfatlösung nachweisbar. In einem Falle mit offenbar nicht vollkommener Hülse zeigten sich, wenn auch unmeßbare, Spuren von Cl schon früher. (Tabelle V, Versuch 2 A und 2 B.) Andererseits zeigt der Versuch 2 A 1 auch nach 25 Tagen noch keine Spur Cl.

5. Wenn man 0,1 n KOH-Lösung gegen destilliertes Wasser diffundieren läßt, so wird das Wasser langsam, aber deutlich, von Tag zu Tag fortschreitend, alkalisch gegen Phenolphthalein. Schon nach 1 oder 2 Tagen wird das bemerkbar. Wenn man aber 0,1 n KOH-Lösung gegen 0,1 n KCl-Lösung diffundieren läßt, so wird das KCl nur sehr langsam, auf alle Fälle viel langsamer als bei destilliertem Wasser alkalisch. Man beachte den Unterschied: HCl diffundiert nicht gegen destilliertes Wasser, aber gegen Neutralsalze; bei KOH ist es umgekehrt (Tabelle V, Versuch 3 A und 3 B). Die Diffusionsversuche mit Laugen bieten die technische Schwierigkeit, daß das Kollodium allmählich angegriffen wird, offenbar durch Verseifung des Cellulose-Nitratesters. Manchmal zerfällt der Boden der Hülse, wenn man die Hülse nach einer Woche aus der Flüssigkeit herausnimmt. Es ist deshalb schwer zu beurteilen, ob bei langfristigen Diffusionsversuchen mit Lauge die Permeabilität der Hülse infolge der Korrodierung erhöht ist. In den Versuchen: KOH gegen destilliertes Wasser, erfolgt die Diffusion so rasch, daß diese Fehlerquelle nicht in Betracht gezogen zu werden braucht. Dagegen in den Versuchen mit KOH gegen KCl erfolgt die Alkalisierung des KCl so langsam, daß der Versuch keinen sicheren Aufschluß darüber gibt, ob die Hülse von vornherein den Durchtritt der OH-Ionen gestattet oder erst

allmählich durch Korrosion für sie permeabel wird. Auf alle Fälle bleibt die Tatsache bestehen, daß der Durchtritt von KOH gegen Wasser gehemmt wird, wenn das Wasser KCl enthält, während umgekehrt der Durchtritt von HCl ins Wasser überhaupt erst ermöglicht wird, wenn das Wasser KCl enthält.

Entsprechende Diffusionsversuche mit 0,01 n KOH-Lösungen haben den Vorteil, daß hier in absehbaren Zeiten keine Korrosion auftritt, aber das Diffusionsgefälle ist hier so vermindert, daß selbst in dem Versuch mit 0,01 n KOH und reinem Wasser in annehmbaren Zeiten keine Diffusion nachweisbar ist, geschweige denn in den Versuchen mit 0,01 n KOH- und 0,01 n KCl-Lösung (Tabelle V, Versuch 4).

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Membran für Anionen praktisch undurchlässig ist. Reine HCl kann gegen destilliertes Wasser nicht diffundieren, weil die H-Ionen nicht durchtreten können, ohne eine äquivalente Menge Cl-Ionen mitzunehmen. Die Cl-Ionen sind aber unbeweglich und können nicht mitgeschleppt werden, die wenigen H-Ionen, welche in die Membran eintreten, erzeugen die Potentialdifferenz, aber keinen analytisch nachweisbaren Übertritt von Säure. Wenn dagegen in beiden Lösungen verschiedene Kationen vorhanden sind, so steht dieses Hindernis nicht im Wege, und der Austausch der Kationen beweist die Permeabilität derselben. Andererseits beweist der mangelnde Austausch der Anionen von KCl und KNO_3, KCl und K_2SO_4 die Impermeabilität der Anionen. Diese Versuche sind eine vollkommene Analogie zu den Diffusionsversuchen mit der Apfelschale[1]), und das getrocknete Kollodium muß als ein vollkommenes Modell für die Apfelschale bezeichnet werden.

Einer besonderen Erklärung bedarf der Diffusionsversuch mit KOH gegen KCl. Es tritt, solange die Hülse intakt ist, keine Diffusion ein, weil zwischen den K-Ionen in beiden Lösungen kein Konzentrationsunterschied besteht, und die Anionen undurchgängig sind. Bei der Diffusion von KOH gegen reines Wasser besteht dagegen eine Möglichkeit eines Austauschs zwischen den K-Ionen des KOH und den H-Ionen des reinen Wassers. Es tritt also nicht einfach KOH aus der Lauge in das Wasser, sondern nur K-Ionen. Dafür diffundieren H-Ionen aus dem Wasser durch die Membran in die Lauge. Jedenfalls würde der Prozeß so verlaufen, wenn wir eine vollkommene Impermeabilität aller Anionen annehmen. Wenn wir den Anionen eine geringe Durchgängigkeit doch noch zuschreiben wollen, so würde sich der soeben beschriebene Austausch der Kationen mit einer langsamen direkten Diffusion von KOH kombinieren. Wieweit der eine oder der andere

[1]) *L. Michaelis* und *A. Fujita*, diese Zeitschr. **158**, 28, 1925.

Vorgang überwiegt, hängt von der individuellen Durchgängigkeit der Hülse für Anionen ab.

Tabelle V. Versuch 1.

Zeit der Beobachtung in Tagen nach der Ansetzung	A			B		
	0,1 n HCl — 0,1 n KCl mit Methylorange			0,1 n HCl — Aqua dest. mit Methylorange		
	1	2	3	4	5	6
1	rötlich	rötlich	rötlich	gelb	gelb	gelb
2	sehr deutl. rot	sehr deutl. rot	sehr deutl. rot	"	"	"
8	" " "	" " "	" " "	Spürchen rötl.	etwas rötlich	"
10	" " "	" " "	" " "	etwas rötlich	" "	"
20	" " "	" " "	" " "	" "	" "	Spürchen rötl.
24	K nachweisbar in HCl	K nachweisbar in HCl	K nachweisbar in HCl	Cl nicht nachweisbar in Wasser	Cl nicht nachweisbar in Wasser	Cl nicht nachweisbar in Wasser

Versuch 2.

Zeit der Prüfung in Tagen nach der Ansetzung	A		B		C	
	0,1 n KCl — 0,1 n KNO_3		0,1 n KCl — 0,1 n K_2SO_4		0,1 n KCl — Aqua dest. mit Phenolphthalein	
	1 *)	2	3	4	5	6
4, 7, 10	Cl nicht nachweisbar in KNO_3	Cl-Spürchen nachweisbar in KNO_3	Cl nicht nachweisbar in K_2SO_4	Cl nicht nachweisbar in K_2SO_4	farblos, Cl nicht nachweisbar in Wasser	farblos, Cl nicht nachweisbar in Wasser
17, 21		Cl nachweisbar in KNO_3				
25			Cl-Spürchen in K_2SO_4	Cl-Spürchen in K_2SO_4	weder K noch Cl nachweisbar i. Wasser	weder K noch Cl nachweisbar i. Wasser

*) Gemeinsames Protokoll für mehrere Parallelversuche mit gleichem Resultat; dagegen ist der Versuch 2 ein vereinzeltes Ausnahmeresultat.

Versuch 3[1]).

Zeit der Beobachtung in Tagen nach der Ansetzung	A			B		
	0,1 n KOH — 0,1 n KCl mit Phenolphthalein			0,1 n KOH — Aqua dest. mit Phenolphthalein		
	1	2	3	4	5	6
1	farblos	farblos	farblos	schwach rötl.	Spürchen rötl.	schwach rötl.
2	"	"	"	deutlich rot	deutlich rot	deutlich rot
3	"	"	"	" "	" "	" "
5	schwach rötl. von unten	"	rot von unten	" "	" "	" "
6	deutlich rot, Cl nicht nachweisbar in KOH	farblos, Cl nicht nachweisbar in KOH	deutlich rot, Cl nicht nachweisbar in KOH	" "	" "	" "
7	Cl nicht nachweisbar in KOH	Cl nicht nachweisbar in KOH	Cl nachweisbar in KOH Hülse korrod.	" "	" "	" "

[1]) Dieser Versuch wurde noch zweimal wiederholt mit gleichem Resultat.

Versuch 4.

Zeit der Beobachtung in Tagen nach der Ansetzung	A			B		
	0,01 n KOH — 0,01 n KCl mit Phenolphthalein			0,01 n KOH — Aqua dest. mit Phenolphthalein		
	1	2	3	4	5	6
1	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos	farblos
12	„	„	„	„	„	„
19	„	„	„	„	„	„

Versuch 5.

Zeit der Prüfung in Tagen nach der Ansetzung	0,1 n KCl — 0,1 n NaCl		
	1	2	3
2	K nicht nachweisbar in NaCl	K nicht nachweisbar in NaCl	K nicht nachweisbar in NaCl
11	K nachweisbar in NaCl	K nachweisbar in NaCl	K nachweisbar in NaCl

Von den Diffusionsversuchen mit *Nichtelektrolyten* möge in dieser Mitteilung nur vorläufig erwähnt werden, daß die ausgetrocknete Kollodiummembran durchlässig für Harnstoff, aber undurchlässig für Traubenzucker ist.

Zusammenfassung.

Eine Membran aus völlig ausgetrocknetem Kollodium hat folgende Eigenschaften:

Bei gröberer Betrachtung erscheint sie so gut wie undurchlässig für Wasser und alle gelösten Stoffe. Eine genauere Untersuchung ergibt jedoch, daß eine geringe Durchlässigkeit noch besteht, welche für die verschiedenen Ionenarten relativ außerordentlich verschieden ist. Die Durchlässigkeit kann erkannt werden: erstens durch die Potentialdifferenzen von zwei verschiedenen Elektrolytlösungen, welche durch die Membran getrennt sind, zweitens durch langfristige Diffusionsversuche unter geeigneten Bedingungen. Beide Methoden ergaben das Resultat, daß Kollodium praktisch völlig undurchlässig für jedes beliebige Anion ist. Das einzige Anion, für welches eine wirklich vollständige Undurchlässigkeit unter allen Bedingungen nicht ganz mit Sicherheit behauptet werden kann, ist das OH-Ion, aber auch dieses ist jedenfalls *relativ* selbst im Vergleich mit den trägsten Kationen praktisch undurchgängig. Dagegen ist das Kollodium für alle einfachen Kationen permeabel. Die Reihenfolge dieser Permeabilität ist dieselbe wie die Reihenfolge der Beweglichkeit in freier wässeriger Lösung, jedoch sind die Unterschiede außerordentlich verstärkt, so daß z. B. das K-Ion relativ zum H-Ion, und das Li-Ion wiederum relativ zum K-Ion als beinahe impermeabel bezeichnet werden kann. Die

Kollodiummembran ist, soweit experimentell überhaupt festgestellt werden kann, ein vollkommenes Modell für die Apfelschale. Es erscheint kaum möglich, die Theorie der Verteilungspotentiale zwischen verschiedenen Phasen auf diese Membranen anzuwenden. Dagegen ist das Verhalten der Kollodiummembran ganz analog dem der Pergamentmembran, welches in der vorangegangenen Arbeit[1]) schon beschrieben worden ist. Nur zeigt sich die Wirkung der kapillaren Spalträume bei der viel dichteren Kollodiummembran in einem viel stärkeren Grade. Bei der Pergamentmembran wurde die Beweglichkeit der Anionen nur etwas vermindert gegenüber der freien Diffusion gefunden; bei der Kollodiummembran erscheint die Beweglichkeit der Anionen praktisch vernichtet, und die Unterschiede der Beweglichkeiten der verschiedenen Kationen treten in übertriebener Abstufung hervor. In beiden Fällen handelt es sich offenbar um eine Wirkung der Kapillarität, deren theoretische Bearbeitung später versucht werden soll.

---

[1]) *A. Fujita*, diese Zeitschr. **159**, 370, 1925.

Über Veränderungen des Stoffwechsels unter Bestrahlung.

Von

Ludwig Pincussen.

I. Mitteilung:

Über Veränderungen des Kalium- und Calciumgehaltes des Blutes unter Bestrahlung.

Von

Irene Makrineos (Lamia, Griechenland).

(Aus der biochemischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 3. Juni 1925.)

In einer Reihe von Arbeiten aus dem hiesigen Institut ist gezeigt worden, daß der Einfluß der Bestrahlung ein außerordentlich mannigfacher ist. Insbesondere werden die Stoffwechselvorgänge in erheblichem Maße verändert. Die Stickstoffmenge, welche der Organismus ausscheidet, ändert sich durch Bestrahlungen in typischer Weise; ähnliches gilt für die einzelnen Komponenten des Stickstoffs, deren Verteilung gegenüber der Norm charakteristische Abweichungen ausweist (1). Ähnlich wie die stickstoffhaltigen Ausscheidungsstoffe, werden auch die Derivate der Purinkörper beeinflußt, wie *Pincussen* (2) in einer Reihe von Untersuchungen nachweisen konnte. Die Kohlenhydrate, die unter abnormen Zuständen beim Diabetes im Harn ausgeschieden werden, verschwinden unter Bestrahlung, besonders bei Sensibilisierung mit gewissen Farbstoffen, vor allem mit Eosin, ganz oder zum Teil aus dem Harn und auch die beim Diabetes vorkommenden Acetonkörper werden zum größten Teil zerstört (3). Die Modifikationen des Stoffwechsels sind also zum Teil unter Bestrahlung ganz gewaltige, besonders wenn man, wie es zuerst von *Pincussen* angegeben worden ist, den Organismus durch fluoreszierende Farbstoffe für die Lichtwirkung sensibilisiert.

Nicht so zahlreich wie die Ergebnisse für den Harn sind die Befunde, welche das Blut betreffen. Wir wissen, daß die im Blute faßbaren Stoffe uns wichtige Anhaltspunkte für den Ablauf des Stoffwechsels geben, wenn man auch sagen muß, daß die Blutanalyse zurzeit ein wenig überschätzt wird, indem sie schließlich nur einen Teil der Verhältnisse uns nahe bringt. Auch für das Blut liegen eine Anzahl wichtiger Ergebnisse vor. So hat z. B. *Pincussen* die Abnahme des Blutzuckers beim Diabetiker unter Bestrahlung nachgewiesen, während *Rothmann* (4) dasselbe für den normalen Organismus erweisen konnte. Über das Verhalten der Stickstoffsubstanzen im Blute belehren unter anderem die Ergebnisse von *Pincussen*, *Anagnostu* und *Zangrides*, daß der Reststickstoff im Blute von Kaninchen, die dauernd am Lichte gehalten bzw. bestrahlt wurden, erheblich abnimmt, und zwar sowohl unter Sonnenlicht wie auch unter der Einwirkung hochkerzigen Glühlichts, wenn die Strahlenwirkung durch einen sensibilisierenden Farbstoff gesteigert wurde.

Noch sehr wenig ist bekannt über das Verhalten der Kationen unter Bestrahlung. Wir wissen, daß der Antagonismus Kalium—Calcium im Organismus eine sehr wichtige Rolle spielt und es ist wohl denkbar, daß durch Bestrahlungen, die so allgemeine Stoffwechseländerungen setzen, auch Verschiebungen zwischen diesen Kationen erfolgen. Hierzu kommt, daß wir, besonders dank den Arbeiten von *Hess* (5) und anderen, wissen, daß die Bestrahlung eine wichtige Rolle bei der Behandlung der Rachitis einnimmt, wobei man wohl ebenso auf gewisse Verschiebungen schließen kann. Um dieser Frage etwas näher zu kommen, habe ich an einer Reihe von Patienten, und zwar an solchen, bei denen irgendwelche Stoffwechselstörungen nicht bestanden — Rekonvaleszenten nach akuten Krankheiten, Rheumatikern, Neurasthenikern —, den Kalium- und Calciumgehalt des Blutes geprüft. Es wurde die Bestimmung stets am Serum des Blutes ausgeführt, welches den Patienten morgens nüchtern entnommen worden war. Die Bestimmungen erfolgten nach den Angaben der Mikromethodik von *Pincussen*, und zwar wurden Calcium und Kalium getrennt in verschiedenen Portionen des Blutes bestimmt.

Die Patienten wurden zunächst ohne Behandlung untersucht; dann folgte in der Regel eine mehrtägige Bestrahlung (3 bis 4 Tage) mit der Quarzlampe (60 cm Entfernung, beginnend je 3 Minuten Bauch und Brust, dann jeden Tag je 1 Minute steigend). Nachdem wiederum untersucht worden war, wurden die Patienten sensibilisiert, und zwar so, daß ihnen der sensibilisierende Farbstoff $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Stunde vor der Bestrahlung in Gelatinekapseln oral verabreicht wurde. Blutentnahme erfolgte stets am nüchternen Patienten; solche, die bestrahlt wurden, blieben bis zur Blutentnahme, welche 1 Stunde

nach der Bestrahlung ausgeführt wurde, ohne Nahrung. Als Sensibilisatoren dienten die zuerst von *Tappeiner* und *Jodlbauer* untersuchten und von *Pincussen* seit ungefähr 12 Jahren für diese Sensibilisierung des Säugetierorganismus angegebenen Farbstoffe: Eosin (bläulich, Kristalle, Höchst) 0,3 bis 0,4 g, Methylenblau (medicinale Höchst 0,25 g), dichloranthracendisulfosaures Natrium 0,25 g und anthrachinondisulfosaures Natrium 0,25 g. Kontrollversuche hatten gezeigt, daß die Einverleibung der Farbstoffe allein einen Einfluß nicht hatte, so daß dieser Versuch im allgemeinen an den Patienten nicht angestellt wurde. Die Resultate sind in nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle I.

K-Gehalt des Serums (mg-Proz.).

Name	Unbehandelt	Bestrahlt	Bestrahlt mit Sensibilisator	
Wi.	21,4	19,0	E 19,9	—
Ma.	19,5	17,25	E 16,7	—
Ob.	21,3	17,75	A 17,0	M 12,8
Pa.	22,75	18,46	M 15,62	D 13,27
Pr.	21,3	18,40	A 14,92	A 14,20
Pu.	21,3	18,50	A 21,0	A 17,4
Sk.	19,2	17,75	E 18,0	E 15,6
Fl.	17,75	13,49	M 14,35	—
Li.	17,75	15,62	D 14,20	—
Ri.	22,5	17,39	E 18,60	—
Go.	21,8	18,8	E 20,3	—
Ko.	22,1	16,4	E 18,06	—

Ca-Gehalt des Serums (mg-Proz.).

Name	Unbehandelt	Bestrahlt	Bestrahlt mit Sensibilisator	
Wi.	10,9	10,4	E 11,0	—
Ma.	10,0	9,0	E 9,0	—
Ob.	11,0	11,0	A 10,9	M 11,6
Pa.	?	11,0	M 10,6	D 11,2
Pr.	10,5	10,0	A 9,0	A 9,5
Pu.	10,0	10,4	A 11,0	A 10,0
Sk.	11,0	10,3	E ?	—
Fl.	11,0	10,4	M 11,4	—
Li.	11,0	10,5	D 9,8	—
Ri.	11,3	11,0	E 11,5	—
Go.	11,5	10,6	E 10,8	—
Ko.	11,4	10,6	E 10,8	—

Anm. E = bläulich; A = Anthrachinondisulfosaures Na; M = Methylenblau; D = Dichloranthracendisulfosaures Na.

Die Ergebnisse sind mit ganz geringen Abweichungen durchaus eindeutig. Wir können zunächst feststellen, daß der Kaliumgehalt des Blutes unter Bestrahlung deutlich abnimmt: das Ausmaß ist etwas verschieden, doch ist die Tendenz außerordentlich eindeutig. Die Abnahmen betragen im allgemeinen nach einer dreimaligen Bestrahlung (also zweimal 3, zweimal 4, zweimal 5 und zweimal 6 Minuten)

ungefähr 10 Proz., in einzelnen Fällen noch erheblich mehr. Was nun die Sensibilisation mit Farbstoffen betrifft, so ergibt die Behandlung mit Eosin zum Teil keine weitere Abnahme, zum Teil sogar eine geringe Zunahme gegenüber den Werten, welche durch vorherige Bestrahlung mit der Quarzlampe ohne Sensibilisator erhalten worden waren. Die Zunahmen sind sogar unter Umständen beträchtlich, die Werte bleiben aber durchaus niedriger als die beim unbestrahlten Patienten.

Anders stellen sich die Resultate dar bei Anwendung von Anthracenfarbstoffen als Sensibilisator. Durchweg gehen die Werte des Kaliums noch unter die bei einfacher Bestrahlung erhaltenen herunter, zum Teil sogar in sehr beträchtlichem Maße. Ganz ähnliches gilt vom Methylenblau, welches ebenfalls ein starkes Herabgehen des Kaliumwertes mit sich führt; es scheint also, daß die verschiedenen Farbstoffe nach ihrer Absorption gewissermaßen spezifisch wirken.

Nicht ganz so klar liegen die Verhältnisse beim Calcium. Man könnte sich vorstellen, daß sich die Wirkungen auf die Rachitis zum Teil darin äußern könnten, daß Calcium aus dem Blute verschwindet. Es scheint aber, daß dies nicht erforderlich ist, indem wir ja das Blut eigentlich nicht als Depot, sondern mehr als Transportmittel ansehen müssen. Nur ein gewisser Stand dürfte im Blute stets gehalten werden, der nur unter ganz besonderen Verhältnissen eine Änderung erfährt. Wir können in der Tat aus dem Calciumgehalt des Blutes die Veränderungen im Stoffwechsel nur sehr bedingt herleiten. Die Tabellen meiner Versuche zeigen, daß die Änderungen des Calciumgehalts bei weitem nicht so ausgeprägt sind, wie die des Kaliumgehalts. In einer Reihe von Fällen, in welchen der Kaliumgehalt starke Veränderungen unter Bestrahlung aufweist, bleibt der Calciumgehalt ganz unverändert. Man kann vielleicht sagen, daß unter Bestrahlung eine leichte Tendenz zur Calciumverminderung besteht, die aber keinesfalls ein größeres Ausmaß erreicht, meistens sogar in die Fehlergrenzen fällt. Auch die Sensibilisierung mit Farbstoffen ändert hieran nicht viel. Unter Eosin besteht so gut wie keine Veränderung, es scheint jedoch, daß die Sensibilisierung mit Methylenblau, auch mit Anthracenfarbstoffen, in einigen Fällen eine leichte Zunahme des Calciums im Blute bedingt. Ich möchte jedoch die Entscheidung, ob wir es hierbei mit etwas Wesentlichem zu tun haben, offen lassen.

Kalium und Calcium sind im Organismus Antagonisten und da erscheint es wohl wichtiger als die absoluten Zahlen, das Verhältnis des Calciums zum Kalium zu untersuchen. Bei der geringen Veränderung, welche die Calciumwerte erleiden, spielt für diesen Quotienten fast nur das Kalium eine Rolle. Stellen wir die gefundenen Werte unter diesem Gesichtspunkt zusammen, so ergibt sich, daß beim Menschen unter Quarzlampenbestrahlung der Quotient K : Ca deutlich abnimmt,

und daß wir gelegentlich zu Werten kommen, welche bis 25 Proz. unter dem Anfangswert des unbestrahlten Patienten liegen (Tabelle II). Entsprechend den vorher mitgeteilten Kaliumergebnissen verringert sich der Quotient noch bei Sensibilisierung mit Methylenblau und Anthracenfarbstoffen, er bleibt konstant oder geht sogar ein wenig gegenüber der Zahl bei einfacher Bestrahlung in die Höhe bei Sensibilisierung mit Eosin. In einigen Fällen finden sich hiervon gewisse Abweichungen. Es wird in der folgenden Abhandlung dargetan werden, daß sich die Ausscheidungsverhältnisse ungefähr umgekehrt proportional zu diesem Verhalten ändern, wenn Kaninchen dem Lichte der natürlichen Höhensonne ausgesetzt werden.

Tabelle II.

Verhältnis K : Ca.

Name	Unbehandelt	Bestrahlt	Bestrahlt mit Sensibilisator	
Wi.	1,97	1,83	E 1,81	—
Ma.	1,95	1,92	E 1,85	—
Ob.	1,94	1,62	A 1,56	M 1,11
Pa.	—	1,67	M 1,48	D 1,19
Pr.	2,03	1,84	A 1,66	A 1,49
Pu.	2,13	1,78	A 1,90	A 1,74
Sk.	1,75	1,72	—	—
Fl.	1,62	1,30	M 1,26	—
Li.	1,62	1,49	D 1,45	—
Ri.	2,00	1,58	E 1,62	—
Go.	1,90	1,77	E 1,88	—
Ko.	1,95	1,55	E 1,66	—

Irgendwelche Folgerungen möchte ich aus meinen Versuchen vorläufig nicht ziehen. Bei der besonders von *Kraus* und seiner Schule vertretenen Lehre von der Wertigkeit des Kaliums und Calciums für die Funktion des parasympathischen bzw. sympathischen Systems, des Kaliums als Korrelat des Vagus, des Calciums als Korrelat des Sympathicus liegt es nahe, die Ergebnisse nach diesen Gesichtspunkten hin auszuwerten. Ich möchte mich von Spekulationen zunächst freihalten, da ich nicht sagen kann, in welcher Weise das augenscheinlich aus dem Blute verschwindende Kalium seinen weiteren Weg macht. Zunächst ist es durchaus nicht klar, ob der geringe Kaliumgehalt des Blutes zurückzuführen ist auf einen geringeren Eintritt von Kalium aus den Geweben oder eine erhöhte Abwanderung. Sicher geht aus den Ergebnissen weiterer Untersuchungen hervor, daß mindestens zum Teil der geringe Kaliumgehalt auf eine erhöhte Abwanderung durch die Nieren zurückzuführen ist: es steht aber dahin, in welcher Weise sich die Zuwanderung aus den Geweben regelt. Wir dürfen eben

nicht vergessen, daß die Hauptfunktion des Blutes die eines Transportmittels ist, und daß seine Analyse allein nicht genügt, um bündige Schlüsse zu ziehen.

Literatur.

1) *L. Pincussen*, Die Einwirkung des Lichtes auf Stoffwechselvorgänge (Zusammenfassung), Strahlentherapie **18**, 625, 1924; *L. Pincussen, Anagnostu* und *Zangrides*, Zeitschr. f. exper. Med. **31**, 410, 1923. — 2) *L. Pincussen* und *K. Momferratos Floros*, diese Zeitschr. **126**, 86, 1921. — 3) *L. Pincussen*, Zeitschr. f. exper. Med. **26**, 127, 1922. — 4) *St. Rothmann*, Klin. Wochenschrift **1924**, Nr. 2, S. 1959. — 5) *A. E. Hess* und *L. J. Unger*, Journ. Amer. med. Assoc. **77**, 39; **78**, 1596, 1921, 1922.

Über Veränderungen des Stoffwechsels unter Bestrahlung.

II. Mitteilung:

Zur Beeinflussung des Mineralstoffwechsels durch Sonnenlicht.

Von

Ludwig Pincussen.

[Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos[1])].

(Eingegangen am 3. Juni 1925.)

In der vorhergehenden Arbeit wurde gezeigt, daß unter Bestrahlung die Kalium- und Calciumwerte des Blutes ganz charakteristische Veränderungen zeigen, die sich in jedem Falle darin äußern, daß das Verhältnis Kalium : Calcium abnimmt, wenn auch graduelle Unterschiede bestehen, welche unter anderem durch die Art des angewandten Sensibilisators bedingt sind.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit dem natürlichen Sonnenlicht angestellt, und zwar in einer günstigen Zeit, Ende März, wo die Höhensonne in Davos (1560 m) schon sehr reich an chemisch wirksamen Strahlen ist. Als Versuchstiere dienten jüngere, helle Kaninchen (nicht Albinos), von einem Gewicht von ungefähr 1200 g. Sie wurden in üblichen Stoffwechselkäfigen gehalten, zunächst eine gewisse Periode lang im fast verdunkelten Raume, und nach Beendigung dieser Periode, welche im allgemeinen 3 Tage dauerte, dem Lichte ausgesetzt; teils dem diffusen Himmelslicht, teils dem Sonnenlicht. Sie blieben täglich ungefähr 8 Stunden am Lichte und wurden zur Nacht wieder in den geschlossenen Raum zurückgebracht. Sammlung des Harns erfolgte in mehrtägigen Perioden; um Zersetzungsvorgänge zu vermeiden, erhielt der Einsatz des Käfigs stets etwas Thymol.

Da möglicherweise die Ernährung auf die Beeinflussung durch Licht einen Einfluß üben konnte, wurden die beiden zum Versuch dienenden Kaninchen verschieden ernährt: das eine erhielt Hafer, das andere gelbe Rüben. Diese Nahrungsmittel zeigen sowohl eine deutliche Verschiedenheit im Gehalt an Calcium und Kalium, wie nachstehende Aufstellung ergibt:

---

[1]) Ich möchte auch an dieser Stelle dem Direktor des Instituts, Herrn *A. Loewy*, für seine freundliche Hilfe bestens danken.

	K_2O	CaO
Hafer	0,45	0,11
Karotten	0,25	0,08

während außerdem die Rübe ein alkalisches, der Hafer ein saures Nährmittel darstellt, indem in ersterer in der Asche die Kationen, im letzteren die Anionen überwiegen. Es war also wohl möglich, daß sich in der Wirkung des Lichtes prinzipielle Unterschiede ergeben würden.

Bei den Analysen interessierte weniger die absolute Menge, wie das Verhältnis der einzelnen Kationen zueinander. Nach den in der vorigen Arbeit mitgeteilten Befunden nimmt unter Bestrahlung das Kalium im Blute ab, während das Calcium nicht so charakteristische Veränderungen aufweist, in jedem Falle war das Verhältnis Kalium—Calcium vermindert. Schon bei diesen Untersuchungen ergab sich die Frage, auf welche Kosten diese Veränderung eintrat, insbesondere ob die Kaliumverminderung im Blute zurückzuführen wäre auf eine Retention oder eine Mehrausscheidung von Kalium gegenüber dem Ca. Die Ergebnisse, welche nachfolgend tabellarisch mitgeteilt sind, beantworten diese Frage im wesentlichen: Dem verminderten Kalium : Calciumquotienten im Blute entspricht eine starke Erhöhung des gleichen Quotienten im Harn. Außerdem ist das Calcium im Harn unter Bestrahlung dem Magnesium gegenüber stark vermindert, der Quotient Ca : Mg nimmt zum Teil sehr stark ab, und zwar bei welcher Nahrung auch immer.

Die absoluten Zahlen der Ausscheidung können aus äußeren Gründen nicht ganz genau mitgeteilt werden; da sie für die gestellte Frage erst in zweiter Linie kommen, sollen sie an dieser Stelle fortbleiben. Es wird gelegentlich eines anderen Versuches darüber weiteres mitgeteilt werden. Ich gebe nachfolgend die Werte des Ca, K und Mg, wenn die K-Werte = 100 gesetzt sind.

	K	Ca	Mg	K : Ca	Ca : Mg
		Karottentier.			
Dunkel 3 Tage	100	5,3	3,1	19	1,73
Licht 3 „	100	3,9	6,9	25,3	0,57
Sonne 3 „	100	3,0	4,8	33,5	0,62
		Hafertier.			
Dunkel 3 Tage	100	25,5	18,5	3,9	1,38
Licht 3 „	100	9,4	4,1 ?	10,6	2,3
Sonne 3 „	100	5,7	9,4	17,6	0,61

Die Analysen der Harnbestandteile erfolgten mit Hilfe von Mikromethoden, welche ich im Anschluß an bestehende Methoden für den Harn ausgearbeitet habe, und die ich ausführlich in der neuen Auflage

meiner Mikromethodik schildere. Es möge an dieser Stelle nur bemerkt sein, daß für die Bestimmung des Kaliums die Fällung als Kaliumkobaltnitrit im Zentrifugenglas, ähnlich wie sie für das Blut ausgearbeitet ist, sehr gute und leicht erreichbare Resultate gibt. Das gleiche gilt für die Fällung des Calciums als Oxalat und die Titration der freigesetzten Oxalsäure mit Permanganatlösung. Nicht unbeträchtliche Schwierigkeiten verursachte zunächst die Ausarbeitung einer Methode der Magnesiumbestimmung in vom Calcium befreiten Harn; schließlich gelang es, unter Überwindung mancher kleiner, im ersten Augenblick kaum erkennbarer und einschätzbarer Schwierigkeiten, das Magnesium als phosphorsaure Ammoniakmagnesia zu fällen und den Niederschlag durch Behandlung mit Molybdat und Hydrochinon zum kolorimetrischen Vergleich zu bringen. Gerade hier ergaben sich anfangs erhebliche Hemmungen, da Verdünnung, Menge der Reagenzien u. a. das Resultat sehr stark beeinflussen können. Die nunmehr durchgearbeitete Methode gibt aber ebenso wie die beiden vorher genannten, sehr gute eindeutige Resultate.

Der Umstand, daß im Harn die Kaliumausscheidung gegenüber der des Calciums vermehrt ist, erscheint bei den Blutbefunden nicht sonderlich überraschend. Was aber bei diesen Ergebnissen überrascht, sind die Ausmaße dieser Veränderung, welche weit über die im Blute beobachteten herausgehen. Wir sehen beim Karottentier das Verhältnis Kalium—Calcium auf fast das Doppelte steigen, beim Hafertier sogar auf ungefähr das Vierfache. Hierfür gibt es nur zwei Erklärungen, die ich hier auf ihre Richtigkeit nur bedingt prüfen kann, da den Tieren die Nahrungsaufnahme freigestellt war: es wird entweder mehr Kalium ausgeschieden oder mehr Calcium retiniert als unter gewöhnlichen Verhältnissen. Denkbar ist natürlich auch eine Verschiebung der Calciumausscheidung durch den Harn oder den Kot. Bis in einem Versuch mit genau dosierter Nahrung diese Verhältnisse exakt festgelegt worden sind, werden wir annehmen müssen, daß diese Verschiebung zum großen Teil auf Kosten des Calciums zu setzen ist, da, wenn wir sie nur auf das Kalium beziehen würden, der Organismus an diesem rapide verarmen würde. Daß aber eine Kaliumabnahme des Organismus an der Erhöhung des Verhältnisses Kalium—Calcium im Harn beteiligt ist, scheint mir schon aus den Ergebnissen der Untersuchung des Blutes in der vorigen Mitteilung hervorzugehen. Für die Calciumretention sprechen auch die Erfolge mit Bestrahlung bei der Rachitis.

Nach der Theorie der *Kraus*schen Schule gilt das Kalium als das Äquivalent des Vagus; im Zusammenhang mit den Blutergebnissen, die schon in der vorigen Arbeit diskutiert wurden, würde anzunehmen sein, daß durch die Bestrahlung die Vagusäquivalente sich zugunsten der Sympathicus-Äquivalente vermindern, so daß also diese Verschie-

bung einen sympathikonischen Komplex bedeuten würde. Ich habe schon an früherer Stelle die Meinung ausgesprochen, daß mit der Bestrahlung unter Umständen ein Sympathicuseffekt einhergehen könnte (anfängliche Erhöhung des Blutzuckers bei Bestrahlung), was durch diese Untersuchungen eine gewisse Stütze erfährt. Über diese Fragen wird noch ausführlicher zu sprechen sein, wenn weitere Versuche vorliegen, insbesondere solche über Veränderung der vagischen bzw. sympathischen Erregbarkeit parallel gehend mit diesen Veränderungen der Ausscheidung.

Eine zweite außerordentlich seltsame Verschiebung ist die Veränderung des Verhältnisses Calcium—Magnesium. Während, wie erwähnt, das Calcium im Verhältnis zum K vermindert ist, nimmt die Ausscheidung des Magnesiums beim Karottentier absolut, beim Hafertier relativ zu und der Quotient Calcium—Magnesium, der beim Karottentier vor der Bestrahlung 1,73, beim Hafertier 1,38 betrug, geht bis ungefähr 0,6 herunter. Eine anfängliche Steigerung beim Hafertier auf 2,3 vermag ich vorderhand nicht zu deuten. In welcher Weise diese Verschiebung vor sich geht und wodurch sie bedingt ist, ist vorläufig unklar. Während das Kalium in allen Fällen zum weitaus größten Teile durch den Harn ausgeschieden wird, erfolgt bekanntlich die Exkretion der Erdalkalien zum großen, vielfach überwiegenden Teile durch den Kot. Es ist wohl möglich, daß durch die Bestrahlung in dem Sinne eine Veränderung gesetzt wird, daß größere Teile des Magnesiums statt durch den Kot im Harn ausgeschieden werden. Wir haben hier keine Parallele zum Blute, da Magnesium dort nicht bestimmt wurde, so daß wir uns ein klares Urteil nicht bilden können. Es scheint aber sicher, daß das Magnesium unter Bestrahlung in zunehmendem Maße im Stoffwechsel eine Rolle spielt.

Eine definitive Stellung zu diesen Ergebnissen zu nehmen, erscheint vor der Hand nicht angängig. Immerhin ist es wichtig, diese außerordentlich eklatanten Verschiebungen zu registrieren. Sie werden weiter verfolgt werden müssen.

Anhangsweise möchte ich noch einige Untersuchungen mitteilen, welche ich über das Verhältnis Kalium—Calcium an verschiedenen Personen in Davos unter frei gewählter Kost gemacht habe. Bei Einheimischen betrug die Relation Kalium : Calcium ungefähr 45, bei zwei jüngeren Personen mit Tuberkulose 12 bis 19. Bei zwei Personen, die nur für einige Wochen in Davos waren, wurde ein Verhältnis 32 gefunden, während nach der Rückkehr nach Berlin ebenfalls unter frei gewählter, aber der Davoser sehr ähnlichen Kost dieses auf 22 zurückging. Ob und inwieweit hier Strahlungseinflüsse mitsprechen, kann vorläufig nicht gesagt werden.

Über Veränderungen des Fermentgehaltes des Blutes.

Von

Ludwig Pincussen.

I. Mitteilung:

Die Beeinflußbarkeit der Nuclease und Lipase.

Von

Eduardo Coelho (Lissabon).

(Aus der biochemischen Abteilung des Städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 3. Juni 1925.)

Während die aus der äußeren Sekretion herstammenden Fermente durch entsprechende Eingriffe leicht in ihrer Menge und vielleicht auch in ihrer Wirksamkeit verändert werden können, gelingt uns dies für die Zellfermente bisher nur in sehr beschränktem Maße. Wir wissen nur, daß unter gewissen Verhältnissen Zellfermente im Blute vorhanden sind. Wir müssen annehmen, daß diese mindestens zum großen Teil aus zugrunde gegangenen Zellen herstammen, deren Fermente nun frei geworden sind und im Blute erscheinen. Dieser Modus gilt mit großer Wahrscheinlichkeit für gewisse eiweißspaltende Fermente, welche, wie *Pincussen* und seine Schüler (1) nachgewiesen haben, bei Bestrahlung des Gesamtorganismus, wie *Pfeiffer* (2) gezeigt hat, bei Verbrühungen im Blute erscheinen. Aber auch ohne so tief greifende Eingriffe können eiweißspaltende Fermente in das Blut abgegeben werden: diese Tatsache bildet, wie bekannt, nach der zuerst von *Pincussen* ausgesprochenen Hypothese die Grundlage der *Abderhalden*schen Reaktion. Solche Fermente, deren Menge bei anomalen Zuständen so erheblich vermehrt ist, daß ihr Nachweis ohne Schwierigkeit gelingt, sind auch im normalen Blute dauernd vorhanden (*Pincussen*). Es ist anzunehmen, daß nicht nur die Organzellen, sondern auch zugrunde gehende weiße Blutkörperchen ihre Fermente an das Blut abgeben. Es ist nun wahrscheinlich, daß auch in ähnlicher Weise wie die eiweißspaltenden die nucleinspaltenden Fermente zu erklären sind, welche regelmäßig im Blute

angetroffen werden (Literatur siehe bei *Pincussen* und *Krause*) (4). Von anderen Fermenten erscheint die Herkunft weniger sicher, z. B. erscheint es nach den bisher vorliegenden Erfahrungen nicht sicher, daß die im normalen Blut regelmäßig vorkommende Lipase oder, richtiger gesagt, das esterspaltende Ferment seine Herkunft aus zugrunde gegangenen Zellen, wenigstens nur aus solchen, herleitet. Die Meinungen über diese Frage sind nicht recht geklärt: nach den neuen Untersuchungen von *Rona* und seinen Mitarbeitern sollen die normalen Lipasen des Blutes sich zwar im wesentlichen aus dem Blute selbst herleiten, ein anderer, vielleicht gelegentlich überwiegender Teil, aus verschiedenen Organen in das Blut ausgeschwemmt werden. Bisher sind uns fettspaltende Fermente aus Zellen nur wenig bekannt: wir sind gewohnt, diese vor allem als Ergebnis der äußeren Sekretion anzusehen, und es scheint durchaus berechtigt, anzunehmen, daß auch durch die innere Sekretion solche Fermente in den Kreislauf gelangen können.

In der nachfolgenden Arbeit wurde versucht, der Frage betreffs der Abstammung zweier Fermente, der Nuclease und der Lipase im Blute auf die Weise näher zu kommen, daß der Einfluß gewisser Pharmaca auf den Gehalt des Blutes an diesen Fermenten geprüft wurde. Wenn es sich um Fermente aus Organen ohne Zellzerstörung handelte, deren Menge von der inneren Sekretion abhängig war, so war auf die betreffenden Eingriffe eine Veränderung zu erwarten; war die Menge der Fermente nur abhängig vom Zugrundegehen von Zellen, einer erhöhten Mauserung also, so konnten darauf nur solche Agentien wirken, welche ein Zugrundegehen der Zellen in höherem Maße in ähnlicher Weise zur Folge haben, wie durch Bestrahlung oder Verbrühung die Menge der eiweißspaltenden Fermente, durch Röntgenbestrahlung die Menge der nucleinspaltenden Fermente im Blute gesteigert wird.

In dem genannten Sinne wurde zunächst geprüft, welchen Einfluß die Injektionen von Adrenalin und Pilocarpin auf den Gehalt des Kaninchenblutes an den betreffenden Fermenten hatten. Es wurde in der Regel angewandt die subkutane Injektion von 1 ccm einer 0,1 proz. Lösung von Suprarenin Höchst bzw. einer 1 proz. Lösung von Pilocarpin. Des weiteren wurde in einzelnen Versuchen der Einfluß von K und Ca geprüft, endlich noch einige für die sogenannte „parenterale Reiztherapie“ verwendete Präparate.

Zunächst möchte ich die Versuche über die Nuclease schildern. Die hierbei geübte Technik entsprach den Angaben von *Pincussen* und *Krause*, welche sich der zuerst von *Pighini* (6) angegebenen und auch von *Neuberg* (7) empfohlenen Methode der optischen Bestimmung dieses Fermentes bedienten. Eine gewisse Menge klar zentrifugierten Serums, meist 0,25 ccm, wurden mit 2 ccm einer 2 proz. Lösung einer Nucleinsäurelösung *Boehringer* und 8 ccm physiologischer Kochsalz-

lösung gemischt und mit einem genauen Landolt-Lippich-Polarisationsapparat die Drehung der in 10-cm-Röhrchen, die mit einem Wassermantel versehen waren, eingefüllten Lösung in gewissen Abständen kontrolliert. Die Röhrchen wurden zwischen den Ablesungen in einem Wasserbade von 37° gehalten. Um einen Überblick zu haben, ob die verschiedene Reaktion einen Einfluß auf die Spaltung ausübt, wurden zwei verschiedene Lösungen von Nucleinsäure verwendet.

	Lösung I	Lösung II
Nucleinsäure *Boehringer*	2 g	2 g
m/3 Natriumphosphat, sekundär . .	10 ccm	12 ccm
m/3 Natriumphosphat, primär . . .	5 ccm	3 „
Wasser	ad 100	ad 100

Im allgemeinen war die Spaltung bei Anwendung der Lösung I besser, das Optimum lag also bei etwas saurerer Reaktion. Es soll jedoch bemerkt werden, daß hiervon einige Ausnahmen beobachtet wurden, ohne daß dem näher nachgegangen wurde.

Die zum Versuch dienenden Kaninchen blieben vom Abend vorher ohne Nahrung. Es wurde das Blut aus der Ohrvene entnommen und sofort die Injektion angeschlossen. Es wurde 1 Stunde darauf wieder Blut entnommen, zentrifugiert und zum Versuch verwendet.

Folgendes Protokoll gibt die Resultate eines Versuchs bei Adrenalininjektion. Da die Ergebnisse mit kleinen Schwankungen ganz einsinnig waren, obgleich eine große Reihe von Versuchen angestellt wurde, dürfte es genügen, ein Beispiel anzugeben.

Minuten	Unbehandelt		Nach Injektion	
	Lösung I	Lösung II	Lösung I	Lösung II
0	0,39	0,36	0,37	0,35
15	0,18	0,14	0,19	0,16
30	0,15	0,13	0,17	0,14
60	0,13	0,12	0,15	0,12
90	0,13	0,11	0,14	0,11
120	0,11	0,10	0,12	0,10

Ganz Ähnliches gilt für die Injektion von Pilocarpin, wobei ebenfalls irgendwelche wesentlichen Differenzen nicht nachgewiesen wurden. Während beim unbehandelten Tier die Drehung der Reaktionslösung von 0,34 bis 0,04 herunter ging, wurde nach Pilocarpininjektion eine Spaltung in der gleichen Zeit (3 Stunden) von 0,32 bis 0,03 beobachtet; in einem anderen Falle ging die Spaltung in der gleichen Zeit bei Anwendung von 0,25 ccm Serum von 0,28 bis 0,05, beim Pilocarpintier von 0,29 auf 0,05 herunter. Ganz ähnliche Verhältnisse fanden sich, wenn Calcium oder Kalium injiziert wurden, 1 ccm einer 10proz. $CaCl_2$

bzw. einer 1proz. KCl-Lösung intravenös, auch wenn Kalium und Calcium zusammen mit Adrenalin oder Pilocarpin eingespritzt wurden. Nachfolgend die Protokolle über die Wirkung von K und Ca.

Intravenöse Injektion von je 1 ccm KCl an zwei aufeinander folgenden Tagen (Lösung II).

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	0,32	0,32	60	0,10	0,10
15	0,13	0,14	120	0,08	0,09
30	0,11	0,12			

Intravenöse Injektion von je 1 ccm $CaCl_2$-Lösung (10proz.) an drei aufeinander folgenden Tagen.

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	0,30	0,29	60	0,09	0,10
15	0,16	0,16	120	0,08	0,08
30	0,12	0,14			

Aus diesen Resultaten scheint sich zu ergeben, daß eine pharmakologische Beeinflussung des sympathischen bzw. parasympathischen Systems zu keiner Veränderung der Nucleinspaltung, zu keiner Vermehrung oder Verminderung der nucleinspaltenden Fermente im Blute führt. Wir dürfen also daraus, wenn auch mit Vorsicht, schließen, daß die normalen nucleinspaltenden Fermente des Blutes durch innere Sekretion nicht beeinflußt werden, sondern daß es sich lediglich um Zellfermente handelt.

Ganz andere Ergebnisse zeigte die Injektion von Substanzen, welche der sogenannten Reiztherapie dienen, und zwar wurde geprüft das Eiweißpräparat Novoprotin und das kombinierte Präparat Yatren-Casein. Nach Injektion von 1 ccm dieser Substanz ergab sich im Vergleich zu den Verhältnissen beim unbehandelten Tier folgendes Bild. Die nachstehende Tabelle zeigt die Drehung bei Anwendung verschiedener Lösungen nach den verschiedenen Zeiten.

Minuten	Lösung I		Lösung II	
	Vor Behandlung	Nach Behandlung	Vor Behandlung	Nach Behandlung
0	0,33	0,34	0,35	0,36
15	0,12	0,15	0,11	0,17
30	0,11	0,12	0,10	0,14
45	0,09	0,12	0,10	0,14
60	0,08	0,11	0,09	0,13
120	0,07	0,11	0,08	0,12
180	0,06	0,11	0,07	0,12

Die zwar nicht sehr starke aber deutliche Hemmung ist außerordentlich auffallend. Wurde die Injektion wiederholt, so war die Hemmung nicht mehr ganz so stark, indem die Spaltung zwar anfangs sehr langsam fortschritt, schließlich aber die beim unbehandelten Tier fast erreichte. Ganz ähnlich waren die Verhältnisse nach Injektion von 1 ccm Novoprotinlösung. Die Drehungsdifferenzen nach 3 Stunden betrugen bei:

	Lösung I	Lösung II
Vor Behandlung	0,24	0,24
1 Std. nach Injektion . .	0,19	0,19
24 „ später	0,18	0,17

Diese Resultate sind sehr schwer zu deuten. Vorläufig muß man wohl annehmen, daß irgendwelche Hemmungsstoffe auftreten, welche den Abbau hindern. Beim Yatren kommt vielleicht der Jodkomponente ein gewisser Einfluß zu. Daß die Zellmauserung durch diese Injektion im negativen Sinne beeinflußt werden könnte, ist wohl kaum anzunehmen.

Im Gegensatz hierzu bewirkt Bestrahlung auch eine Zunahme der Zerstörung der Zellkerne, wenn auch der Einfluß bei weitem nicht so groß erwartet werden darf, als wir es bei den Röntgenstrahlen kennen; [vgl. dazu *Pincussen* und *Floros* (8)]. Wurde ein weißes Kaninchen 15 Minuten in einem Abstand von 60 cm mit der Quarzlampe (künstliche Höhensonne) bestrahlt und nach 30 Minuten wiederum Blut abgenommen, so ergab der Vergleich der Spaltung vor und nach der Bestrahlung einen deutlichen, wenn auch nicht sehr starken Ausschlag zugunsten des nach der Bestrahlung entnommenen Blutes, wie nachfolgende Tabelle (Lösung II) zeigt.

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	0,27	0,27	60	0,13	0,11
15	0,18	0,15	120	0,09	0,07
30	0,16	0,12	180	0,07	0,05

Es resultiert also eine deutliche, wenn auch nicht sehr hochgradige Zunahme der Spaltung, welche auch besonders zu beobachten ist, wenn das Versuchstier vor der Bestrahlung mit Eosin sensibilisiert wurde.

Man darf im allgemeinen wohl auf Grund dieser Versuche sagen, daß die Nucleotidasen, also die ersten Fermente der Purinspaltung, welche sich im Blute finden, mit großer Wahrscheinlichkeit nur aus zugrunde gehenden Zellen stammen und nur in ihrer Menge durch solche

Einflüsse verändert werden, welche die Zerstörung von Zellen, vor allem wohl ihrer Kerne, erhöhen.

Das zweite Ferment, das ich prüfte, war die im Blute regelmäßig vorhandene Lipase. Ihre Herkunft ist bisher ganz und gar strittig. Es wird im allgemeinen unterschieden zwischen solchen Lipasen, welche sich allgemein im Blute finden, und solchen, welche durch irgendwelche Prozesse aus den Organen in das Blut gelangen. Wir sind bisher außerordentlich mangelhaft darüber unterrichtet, ob auch bei Zerstörung von Zellen Lipasen auftreten. Wir neigen im allgemeinen dazu, daß die größte Menge der fettspaltenden Fermente aus dem Pankreas herrührt. Doch hat z. B. schon *Rona* in einer Reihe von Extrakten verschiedener Organe, die in Verfolg der von *Michaelis* und *Rona* angegebenen Methodik geprüft wurden, das Vorhandensein einer Monobutyrase nachweisen können. Es fragt sich nun, ob die im Blute vorhandene Lipase aus solchen Organzellen herstammt, wir uns also ihr Vorkommen ebenso zu deuten haben, wie das der eben besprochenen Nucleotidase, oder ob es aus der inneren Sekretion, wahrscheinlich des Pankreas herrührt. In Versuchen von *Rona* und seinen Mitarbeitern ist durch Einwirkung von Giften in gewissem Maße eine Abgrenzung zwischen diesen beiden Möglichkeiten gelungen. In Fortführung der anfangs betonten Gedankengänge mußte sich durch pharmakologische Beeinflussung erweisen lassen, ob die im Blute vorhandene Lipase aus zugrunde gegangenen Zellen oder aus der inneren Sekretion stammt, indem im letzteren Falle durch solche Eingriffe eine Veränderung ausgelöst werden mußte.

Die eingeschlagene Methodik entsprach durchaus den von *Michaelis* (10) gemachten Angaben. Es wurde durch starkes Schütteln von Wasser mit Tributyrin — will man eine wirklich gesättigte Lösung haben, so muß das Schütteln mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde lang fortgesetzt werden — die Tributyrinlösung hergestellt, zu 100 ccm 6 ccm sekundäres und 1 ccm primäres m/3 Phosphat zugefügt und zum Versuch 0,25 ccm Serum mit 50 ccm dieser Mischung vermischt. Ein Parallelversuch mit inaktiviertem Serum lief stets daneben. Mit einer einfachen Tropfpipette (Wassertropfenzahl 98) wurde in Zwischenräumen die Tropfenzahl der im übrigen bei Bruttemperatur gehaltenen Lösung geprüft. Die Versuche wurden auch hier an Kaninchen, im allgemeinen zugleich mit den Versuchen über die Nucleinspaltung ausgeführt: es kam also ebenfalls die Wirkung von Adrenalin, Pilocarpin, Kalium, Calcium und auch der übrigen oben genannten Substanzen zur Prüfung. Von einer Wiedergabe der Resultate in Kurvenform, welche ja die beste Übersicht bietet, wird aus Raumersparnis abgesehen.

Die Wirkung von Adrenalin (1 ccm): Blutentnahme 1 Stunde nach Injektion, zeigt sich sehr deutlich in folgendem Versuch, der

zugleich auch die Wirkung der intravenösen Injektion von 1 ccm einer Mischung gleicher Teile von Suprareninlösung und 20proz. $CaCl_2$-Lösung (intravenös) enthält:

Minuten	Vorher Tropfen	Nach Adrenalin Tropfen	Nach Adrenalin und Ca Tropfen
0	137	138	134
20	108	130	109
60	99	104	100

Die Hemmung der Fettspaltung durch Adrenalin ist also sehr deutlich ausgesprochen; andere Versuche, die in größerer Zahl angestellt wurden, fielen ebenso, wenn auch verschieden ausgeprägt aus. Zu bemerken ist, daß durch Calcium die Adrenalinwirkung ganz aufgehoben wird.

Die Wirkung von $Ca^{\cdot\cdot}$ allein (1 ccm) einer 10proz. $CaCl_2$-Lösung (intravenös) steigert die Esterspaltung, wenn auch nicht ganz gleichmäßig. Nachfolgend ein Beispiel.

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	141	141	40	112	105
20	119	112	60	106	102

Ob die in dem vorigen Protokoll ersichtliche $Ca^{\cdot\cdot}$-Wirkung lediglich auf einer Kombination beruht, oder ob es sich um eine antagonistische Wirkung des Calciums gegenüber dem Adrenalin an der Erfolgsstelle handelt, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Im Gegensatz zu der sehr deutlichen Wirkung des Adrenalins, welche zweifellos auf eine innersekretorische Einwirkung schließen läßt, ist die des Pilocarpins (0,1 proz. Lösung) wenig ausgeprägt, wenn auch gelegentlich geringe Steigerungen der Fettspaltung beobachtet werden. Ein Beispiel der meist vorhandenen Wirkungslosigkeit gibt folgende Tabelle.

Minuten	Vorher	Nachher
0	137	137
20	113	112
60	102	102

Injektion von Pilocarpin 0,5 ccm + $CaCl_2$ 20proz. 0,5 ccm intravenös ergibt, entsprechend der Wirkung des Calciums allein, eine leichte Förderung der Esterspaltung.

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	139	139	40	110	105
20	117	109	60	102	99

Im Gegenteil zum Calcium wirkt das $K^{\cdot}$-Ion schädigend auf die Esterspaltung. Im allgemeinen wurde die intravenöse Injektion von

1 ccm 1 proz. Lösung von KCl vom Kaninchen gut vertragen, in einem Falle starb das Tier bei der Injektion, ohne daß ein anderer Grund dafür vorlag. Bei einem Tier, welches 2 Tage hintereinander je 1 ccm der Lösung intravenös erhielt, und von welchem das Blut 10 Minuten nach der letzten Injektion abgenommen wurde, waren die Resultate die folgenden:

Minuten	Vorher	Nachher	Minuten	Vorher	Nachher
0	141	139	40	110	120
20	135	137	60	103	109

Es scheint sich aus diesen Versuchen also zu ergeben, daß sowohl das Adrenalin wie die antagonistischen Ionen $K^{\cdot}$ und $Ca^{\cdot\cdot}$ ihre Wirkung über das Nervensystem entfalten und in bisher nicht aufgeklärter Art die in der inneren Sekretion sezernierte Lipase beeinflussen.

Auch die intravenöse Eiweißinjektion, die in Form von Novoprotin gemacht wurde, übt auf die Lipase einen Einfluß aus, der hier in einer Förderung besteht, also in ähnlicher Weise wie das Calcium. Nachfolgend ein Versuch.

Minuten	Vorher	Nachher
0	135	133
20	131	121
60	111	108

Nicht uninteressant ist, daß ein anderes Präparat, welches ebenfalls zur sogenannten parenteralen Reiztherapie gebraucht wird, das Yatren-Casein, also eine Verbindung von Eiweiß mit einem jodhaltigen Komplex, das Gegenteil bewirkt. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse nach einmaliger und zweimaliger Behandlung.

Minuten	Vorher	Einmalige Behandlung	Zweimalige Behandlung
0	138	138	138
20	111	115	125
60	96	105	106

Die hier beobachtete Hemmung entspricht durchaus der bei dem nucleinspaltenden Ferment geschilderten. Wir dürfen wohl nicht fehl gehen, wenn wir auch diese auf die Jodkomponente zurückführen.

Es muß noch bemerkt werden, daß gerade das esterspaltende Ferment von gewissen, bisher nicht näher erforschten Verhältnissen der Tiere, ihrem Ernährungszustand und noch anderen Dingen abhängig ist. In den vorliegenden Versuchen wurde darauf Wert gelegt, daß die Versuche stets unter denselben Bedingungen ausgeführt wurden, wie natürlich die Kontrollversuche stets am gleichen Tier ausgeführt sind.

wie die entsprechenden Zellversuche. Die Untersuchungen über das esterspaltende Ferment scheinen keinen Zweifel zu lassen, daß, im Gegensatz zur Nucleotidase, die Menge dieses Ferments im Blute durch pharmakologische Maßnahmen, speziell solche, welche das sympathische Nervensystem betreffen, in hohem Grade beeinflußbar ist und daß zum mindesten zum großen Teil das Ferment aus der inneren Sekretion stammt.

Daß es sich nur zum verhältnismäßig kleinen Teil um Fermente handelt, welche aus zugrunde gegangenen Organzellen stammen, scheint sich daraus zu ergeben, daß auch durch weitgehende Zerstörungen von Organen die esterspaltende Fähigkeit des Blutes, wenigstens in den von mir untersuchten Fällen, eine Steigerung nicht aufwies. Man hat vielfach die Menge der Lipase im Blute mit der Lungentuberkulose in Verbindung gebracht und in solchen Fällen ein geringeres lipolytisches Vermögen im Blute festgestellt. Auch diese Feststellung würde nicht für die Herkunft aus Zellen, die ja bei der Tuberkulose in reichlichem Maße zugrundegehen, sprechen. Ich möchte hier einen zufälligen Befund mitteilen, den ich an einem Kaninchen machte, welches kurz darauf an einer Pneumonie einging. Mit der gleichen Tropfpipette, die ich sonst verwendete, und bei einer Mischung von 1 ccm Serum mit 50 ccm Tributyrinlösung ging die Tropfenzahl in 60 Minuten nur von 147 bis 124 herunter, während bei einer Mischung von 0,5 ccm Serum auf 50 ccm Tributyrinlösung die anfängliche Tropfenzahl von 148 in 1 Stunde nur bis 142 herunterging. Das lipolytische Ferment war also nur, trotz der starken Zelleinschmelzung, in ganz geringem Maße, weit unter der Norm vorhanden. Auch dies spricht dafür, daß das Zugrundegehen von Zellen für den Gehalt des Blutes an esterspaltendem Ferment, wenigstens soweit meine Versuche reichen, nur von untergeordneter Bedeutung ist.

Literatur.

1) *Groppler*, Über die Beeinflussung der Blutfermente durch Licht, Med. Diss. Berlin 1914. — 2) *H. Pfeiffer*, Über das Verhalten der peptolytischen Fermente in Serum und Harn verbrühter und photodynamisch geschädigter Kaninchen, Zeitschr. f. Immunf. **23**, 473, 1915. — 3) *L. Pincussen*, Untersuchungen über die fermentativen Eigenschaften des Blutes. I., diese Zeitschr. **51**, 107, 1913. — 4) *L. Pincussen* und *Ch. Krause*, dgl. Mitteilung III: Über Nucleasen und glucosidspaltende Fermente, ebendaselbst **63**, 269, 1914. — 5) *P. Rona, H. Petow, H. Schreiber*, Methode zum Nachweis blutfremder Fermente im Serum. Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 2, S. 2366. — 6) *G. Pighini*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 85. — 7) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **80**, 505. — 8) *L. Pincussen* und *K. Momferratos Floros*, Über den Einfluß der Strahlung auf den Nucleinstoffwechsel, ebendaselbst **126**, 86, 192. — 9) *P. Rona*, ebendaselbst **32**, 482, 1911. — 10) *L. Michaelis* Praktikum der physik. Chemie.

Über den Einfluß der Injektion von pflanzensekretinhaltigen Lösungen auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Minko Dobreff (Bulgarien).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 4. Juni 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Nachdem von *Neuberg, Gottschalk* und *Strauss* (1) im Jahre 1923 zum ersten Male der klare Beweis für die oxydationssteigernde Wirkung des Insulins beim Kohlenhydratabbau erbracht worden war, indem diese Autoren mit Hilfe des *Neuberg*schen Abfangverfahrens ein unzweifelhaftes Oxydationsprodukt, den Acetaldehyd, in vermehrter Menge unter der Insulinwirkung nachweisen konnten, ist durch eine Fülle von Arbeiten, die in dem kürzlich erschienenen Buche von *Laqueur* (2) über das Insulin übersichtlich zusammengestellt sind, und zu denen auch die Veröffentlichungen aus dem hiesigen Laboratorium von *Bickel* und *Collazo* (3), wie von *Collazo, Händel* und *Rubino* (4) zählen, der Einfluß des Insulins auf den Anbau und Abbau der Kohlenhydrate genauer studiert worden, ohne daß es, wie *Laqueur* mit Recht betont, bisher möglich geworden ist, das Insulinproblem einer endgültigen Lösung zuzuführen.

Nun finden sich auch bekanntlich in Pflanzen insulinähnlich wirkende Körper, denen auch in unserem Laboratorium bereits vor der Entdeckung des Insulins Aufmerksamkeit zugewandt wurde [*van Eweyk* (5)]. Auch von den Vitaminen hat z. B. *Uhlmann* (6) schon vor einigen Jahren behauptet, sie hätten gewisse antidiabetische Eigenschaften. Ein ganz besonderes Interesse aber hat die Frage, welche Wirkungen die Sekretinsubstanzen auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel ausüben, und ob die die äußere Sekretion der Drüsen beeinflussenden Stoffe auch innersekretorische Wirkungen oder Wirkungen auf bestimmte nicht sekretorische Drüsenzellenleistungen haben können. Dabei denken wir vor allem an die Insulinproduktion im Pankreas, und an die Beziehungen der Leberzellen zum Kohlenhydratstoffwechsel.

Ein Sekretin aber löst durch seine Entfesselung der äußeren Sekretion der Drüsen allein schon eine starke Stoffbewegung im Körper aus, wie das *Onohara* (7) in unserem Laboratorium auch neuerdings wieder zeigen konnte. Die erste Frage, die studiert werden mußte, und die der Gegenstand meiner vorliegenden Studie ist, war die, in welcher Weise bei Tieren durch die Injektion von Pflanzensekretinlösungen (*Bickel*) der intermediäre Kohlenhydratstoffwechsel beeinflußt wird.

Methodisches und Plan der Arbeit.

Objekt meiner Versuche war der Blutzuckerspiegel von Tauben. Um den Kontrast deutlicher zu machen, habe ich zuerst die Versuchstauben einer B-avitaminotischen Diät unterworfen. Wie wir schon wissen [*Collazo* (8)], steigt der B. Z.[1])-Spiegel während der Avitaminose bis zu einer sehr erheblichen Hyperglykämie an.

Ich hatte im ganzen sechs Tauben. Drei von diesen wurden zur Kontrolle normal gefüttert. Die anderen drei Versuchstauben wurden zuerst auch einige Tage zum Vergleich normal gefüttert (17. bis 21. März) und erst dann begann bei ihnen die Zwangsfütterung, den Kontrolltauben wurde während der ganzen Versuchsdauer nur Wasser und ungeschälte gelbe Erbsen ad libitum angeboten. (Wir haben schon mehrere Male bei verschiedenen Gelegenheiten monatelang Tauben nur mit solchen gelben Erbsen gefüttert, ohne irgendwelche avitaminotische oder andere äußere pathologische Symptome beobachtet zu haben.)

Nachdem die Versuchstauben 5 Tage mit ungeschälten gelben Erbsen gefüttert worden waren, wurden sie weiter bis zum Eintreten von ausgesprochenen Taubenberiberisymptomen jeden Tag zweimal (morgens und abends) mit B-avitaminotischer Nahrung zwangsgefüttert. Das Futter wurde in Pillen bereitet. Die Zusammenstellung der Pillen wurde nach dem folgenden Rezept angestellt. Bei der Pillenzubereitung wurde immer destilliertes Wasser gebraucht.

Futter für B-Avitaminose (täglich für eine Taube):

Casein (gereinigt, entfettet)	4,0 g
Polierter Reis (autoklavisiert 4 Stunden bei 130 bis 140° C und 5 Atmosphären)	10,0 g
Schweineschmalz (ausgelassen)	1,0 g
*Osborne*sches Salzgemisch	1,0 g

als Pillen bereitet, von denen die Hälfte morgens und die andere Hälfte abends in den Kropf eingeführt wurde.

Die pathologischen Veränderungen, die sich allmählich bei den zwangsgefütterten Tauben einstellten, sind aus den folgenden Protokollauszügen sowie hinsichtlich der Gewichtsänderungen aus der Tabelle I zu ersehen.

---

[1]) B. Z. = Blutzucker.

Tabelle I.

Datum	Körpergewicht in g						Bemerkungen
	Zwangsgefütterte Tauben			Normale Tauben			
	I. Taube ♂	II. Taube ♂	III. Taube ♀	I. Taube ♂	II. Taube ♂	III. Taube ♀	
17. III.	362	294	282	317	297	312	
18. III.	351	286	276	316	296	311	
19. III.	352	297	282	317	297	302	
20. III.	352	292	282	327	307	327	
21. III.	362	297	287	327	317	317	
22. III.	365	295	295	330	325	325	22. III. Beginn der Zwangsfütterung
23. III.	370	310	295	340	330	335	
24. III.	375	320	295	345	340	335	
25. III.	365	315	285	330	330	320	
26. III.	370	315	285	335	335	325	
27. III.	355	305	275	320	320	315	
28. III.	360	305	285	325	315	315	
29. III.	365	310	285	325	335	325	
30. III.	360	315	290	325	325	320	
31. III.	365	320	300	320	335	330	
1. IV.	365	310	300	320	335	325	
2. IV.	365	315	300	325	330	320	
3. IV.	359	309	284	314	334	324	
4. IV.	354	289	269	309	334	324	
5. IV.	359	294	289	319	349	339	
6. IV	350	290	280 †	314	350	340	
7. IV.	339	289		314	344	324	
8. IV.	329	289		314	344	334	
9. IV.	330	300		320	350	335	
10. IV.	316	276		306	341	316	
11. IV.	316	276		311	346	331	
12. IV.	316	280 †		316	356	336	
13. IV.	306			321	356	331	
14. IV.	305			320	350	335	
15. IV.	305			310	350	335	
16. IV.	295			315 †	340	335	
17. IV.	295				340	330	
18. IV.	295				350	335	
19. IV.	290				345	335	
20. IV.	290 †				340	330	

Nachdem bei allen sechs Tauben der Grundwert des Blutzuckergehaltes am 21. März (vor Beginn der Zwangsfütterung) zum erstenmal bestimmt worden war, wartete ich, bis sich die ausgesprochenen Taubenberiberi-Symptome eingestellt hatten. Dann wurden bei diesen prädiabetischen avitaminotischen Tauben wieder Blutentnahmen gemacht bzw. der B. Z.-Gehalt bestimmt und erst dann, gewöhnlich nach 15 Minuten, die Sekretinlösung intramuskulär (Mm. pectorales majores) injiziert. Bei allen Taubenversuchen habe ich *Spinatsekretin*, und zwar in gleicher Dosis gebraucht; immer 3 ccm = 3 g Blättertrockensubstanz (junge Blätter). Die sich nach der Sekretininjektion einstellende Veränderung im Charakter des B. Z.-Spiegels wurde durch periodische

Blutentnahme (Flügelarterie) bzw. B. Z.-Bestimmungen, registriert. Die Zeitperioden nach der Injektion, in denen die Blutentnahmen gemacht wurden, sind aus den folgenden Protokollauszügen und der zusammenfassenden Tabelle II zu ersehen.

Schon beim ersten Versuch beobachtete ich kurz nach der Sekretininjektion, statt einer Verbesserung des Allgemeinzustandes der Tauben, im Gegenteil eine hochgradige Verschlimmerung des pathologischen Komplexes. Die Schläfrigkeit, mit der sich die Versuchstauben noch vor der Injektion auszeichneten, wurde nach der Injektion durch einen leichten bzw. ausgesprochenen soporösen Zustand ersetzt. Die erste B. Z.-Analyse zeigte schon eine intensive Steigerung des B. Z.-Spiegels. Bei der zweiten Blutentnahme nach der Injektion zeigte sich ein noch größerer Anstieg des B. Z.-Gehaltes (bei einem Versuch um etwa 0,11!). Die Blutentnahmen bei den prädiabetischen Versuchstauben sind immer 15 bis 20 Stunden nach der letzten Zwangsfütterung ausgeführt worden. Die weiteren Veränderungen, die sich nach der Sekretininjektion bei den Tauben einstellten, werden genauer bei der Besprechung der ihnen entsprechenden Versuche erörtert.

Experimente.

Versuche mit Tauben.

Versuch 1. Taube III, ♀, 6. April 1924 ausgesprochene Taubenberiberisymptome. 11 Uhr 45 Minuten Blutentnahme ante injekt. B. Z. (*Bangs* Methode) 0,38 Proz. (Grundwert des B. Z.-Gehaltes am 21. März 0,18 Proz.). 12 Uhr 3 ccm = 3 g Blättertrockensubstanz Spinatsekretin intramuskulär. 12 Uhr 15 Minuten Brechreiz; wegen hochgradiger Schwäche nur etwas erbrochen; der größte Teil der Brechmasse bleibt in den oberen Teilen der Speiseröhre. Vollständige Entkräftigung. 12 Uhr 28 Minuten Erstickungstod (die Pupillen erweitert). 12 Uhr 35 Minuten (7 Minuten post mortem). Blutentnahme mit der Spritze aus dem rechten Ventrikel; B. Z. 0,43 Proz. (+ 0,05).

Versuch 2. Taube II, ♂, 8. April 1924. Ausgesprochene Taubenberiberisymptome. 5 Uhr 45 Minuten nachmittags Blutentnahme ante injekt. B. Z. 0,22 Proz. (Grundwert des B. Z.-Gehalts am 21. März 0,18 Proz.). 6 Uhr 2 ccm Spinatsekretin subkutan + 1 ccm intramuskulär; im ganzen = 3 g Blättertrockensubstanz. 6 Uhr 30 Minuten erste Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,29 Proz. (+ 0,07). 7 Uhr zweite Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,33 Proz. (+ 0,11). 8 Uhr dritte Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,35 Proz. (+ 0,13). Hochgradige Schwäche. Ausgesprochene Krämpfe. Die Taube bekommt nach der letzten Blutentnahme eine Tablette *Vitaminose* (vitaminreiches Präparat) per os. Abends wird die Taube nicht zwangsgefüttert.

Am nächsten Tage ist der Allgemeinzustand gebessert.

Versuch 3. Taube II, ♂, 12. April 1924. Wieder ausgesprochene Taubenberiberisymptome. 2 Uhr 15 Minuten Blutentnahme ante injekt. B. Z. 0.22 Proz. 12 Uhr 30 Minuten 3 ccm = 3 g Blättertrockensubstanz Spinatsekretin intramuskulär. 3 Uhr erste Blutentnahme post injekt.

Tabelle II.

Veränderungen des Blutzuckerspiegels nach Einverleibung von Spinatsekretin (= 3 g Blättertrockensubstanz) intramuskulär (mm pectorales majores).

Die Zwangsfütterung hat bei den avitaminotischen Tauben am 22. III. begonnen.

	Gewicht in g		I. Bemerkungen	Grundwert des Blutzuckergehaltes in Proz.	Blutzuckergehalt in Proz. ante injekt.	Zeit der Injektion	Blutzuckergehalt in Proz. post injekt.			II. Bemerkungen
	am 21. III.	am Versuchstage					Erste Blutentnahme	Zweite Blutentnahme	Dritte Blutentnahme	
Avitaminose Taube I, ♂ 1. Versuch .	361	20. IV.: 290	typische Taubenberiberi	21. III.: 0,168	20. IV., 11h 15′: 0,262	11h 30′	12h 30′: 0,328 (+ 0,066)	1h 00′: **0,380** (+ 0,118)	1h 30′: 0,370 (+ 0,108)	1 h 45′. 1 Tablette Vitaminose per os. In der Nacht gestorben.
Avitaminose Taube II, ♂ 1. Versuch .	296	8. IV.: 289	typische Taubenberiberi	21. III.: 0,176	8. IV., 5h 45′: 0,220	6h 00′	6h 30′: 0,293 (+ 0,073)	7h 00′: 0,330 (+ 0,110)	8h 00′: **0,348** (+ 0,128)	8 h 10′. 1 Tablette Vitaminose per os.
2. Versuch .	296	12. IV.: 280	typische Taubenberiberi	21. III.: 0,176	12. IV., 2h 15′: 0,220	2h 30′	3h 00′: 0,264 (+ 0,044)	3h 30′: **0,328** (+ 0,108)	—	3 h 36′. 1/2 Tablette Vitaminose per os. 4 h 00′. 1/4 Tablette Vitaminose im destill. Wasser gelöst intramuskulär. † 7 Uhr.
Avitaminose Taube III, ♀ 1. Versuch .	286	6. IV.: 280	typische Taubenberiberi	21. III.: 0,179	6. IV., 11h 45′: 0,384	12h 00′	12h 35′: 0,427 (+ 0,043)	—	—	† 12 h 28′. Die Blutentnahme ist post injekt. mit der Spritze aus dem rechten Ventrikel gemacht worden.
Kontrolltaube I, ♂ 1. Versuch .	326	16. IV.: 315	Normal	21. III.: 0,178	16. IV., 11h 45′: 0,173	12h 00′	1h 00′: 0,221 (+ 0,048)	—	—	Weitere Blutentnahmen waren unmöglich. Die Taube ist in der Nacht gestorben.

B. Z. 0,26 Proz. (+ 0,04). 3 Uhr 30 Minuten zweite Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,33 Proz. (+ 0,11). Weitere Blutentnahme war unmöglich. (Im allgemeinen waren die Blutentnahmen nach der Sekretininjektion bei den Tauben sehr schwer auszuführen. Das Relief der peripheren Blutgefäße verschwindet völlig nach der Einverleibung des Sekretins. Das Blut wird „dicker".) Hochgradige Schwäche. 3 Uhr 36 Minuten eine halbe Tablette Vitaminose per os. (Schlundreflex erloschen. Die Tablettenstückchen mit Glasstäbchen hinuntergebracht.) 4 Uhr eine viertel Tablette Vitaminose in destilliertem Wasser gelöst intramuskulär injiciert. 4 bis 7 Uhr die Taube im agonalen Zustand. 7 Uhr Tod nach vollständiger Entkräftigung. Die Atmung war im agonalen Zustand frequenter, ganz oberflächlich und pfeifend.

Versuch 4. Taube I, ♂, 20. April 1924. Ausgesprochene Taubenberiberisymptome. 11 Uhr 15 Minuten Blutentnahme ante injekt. B.-Z. 0,26 Proz. (Grundwert des B. Z. am 21. März 0,17 Proz.) 11 Uhr 30 Minuten 3 ccm = 3 g Blättertrockensubstanz Spinatsekretin intramuskulär. 12 Uhr 30 Minuten erste Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,33 Proz. (+ 0,07). 1 Uhr zweite Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,38 Proz. (+ 0,12); 1 Uhr 45 Minuten eine Tablette Vitaminose per os. Tod in der Nacht.

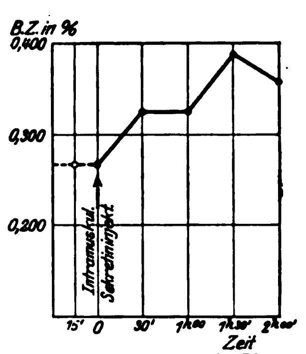
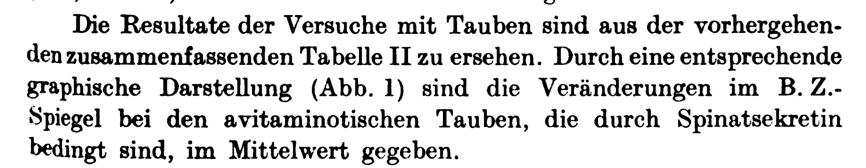


Abb. 1. Verhalten des Blutzuckerspiegels bei avitaminotischen Tauben nach Spinatsekretininjektion. Durchschnittswerte aus vier Versuchen.

Dieselben Versuche wurden auch mit einer normalen Kontrolltaube ausgeführt. Es zeigte sich hier gleichfalls eine Steigerung des B. Z.-Gehalts nach der Spinatsekretininjektion. Die B. Z.-Steigerung aber bei den avitaminotischen Tauben war höher (nach 60 Minuten um etwa + 0,1 Proz.) als bei der normalen (nach 60 Minuten etwa + 0,05 Proz. gesteigert).

Versuch 5. Kontrolltaube I, ♂, 16. April 1924. Normal. 11 Uhr 45 Minuten Blutentnahme ante injekt. B. Z. 0,17 Proz. (Grundwert des B. Z.-Gehalts am 21. März 0,18 Proz.). 12 Uhr 3 ccm = 3 g Blättertrockensubstanz Spinatsekretin intramuskulär. 1 Uhr erste Blutentnahme post injekt. B. Z. 0,22 Proz. (+ 0,05 Proz.). Weitere Blutentnahmen unmöglich. Tod in der Nacht.



Die Resultate der Versuche mit Tauben sind aus der vorhergehenden zusammenfassenden Tabelle II zu ersehen. Durch eine entsprechende graphische Darstellung (Abb. 1) sind die Veränderungen im B. Z.-Spiegel bei den avitaminotischen Tauben, die durch Spinatsekretin bedingt sind, im Mittelwert gegeben.



Veränderungen des Blutzuckerspiegels des normalen Hundes durch Pflanzensekretininjektionen.

Zweites Objekt meiner Untersuchungen war der B. Z.-Spiegel eines normalen Hundes. Bei diesen Versuchen habe ich, auf das Körpergewicht berechnet, fünfmal weniger Sekretin appliziert als bei den

Taubenversuchen, nämlich 2 g Blättertrockensubstanz pro Kilogramm Körpergewicht (bei den Tauben 10 g). Die Injektionen wurden subkutan am Rücken ausgeführt. Trotz der viel kleineren Dosis des applizierten Sekretins wurde der B. Z.-Spiegel auch bei dem Hunde gesteigert, wenn auch nicht so hoch wie bei den entsprechenden Taubenversuchen. Beim ersten Versuch habe ich *Brennesselsekretin* (Urtica dioica L.) und bei dem zweiten *Spinatsekretin* gebraucht.

Die bei meinen Versuchen gebrauchten Sekretinflüssigkeiten wurden nach dem üblichen Verfahren durch Hydrolysieren mit 5proz. Schwefelsäure hergestellt. [Vgl. hierzu die Vorschriften bei *Dobreff* (9) (10)].

Es sei hier bemerkt, daß die unangenehmen Nebenerscheinungen (Verschlimmerung des Allgemeinzustandes, Verschwinden des Reliefs der peripheren Blutgefäße usw.), die wir bei den entsprechenden Taubenversuchen immer wieder beobachteten, bei den Versuchen mit dem Hunde vollkommen fehlten. Das ist leicht erklärlich durch die großen Unterschiede der Dosis des applizierten Sekretins bei der einen und bei der anderen Versuchsgruppe. Einen Überblick über die hyperglykämische Wirkung der Pflanzensekretine auf den B. Z.-Spiegel des normalen Hundes geben die folgenden Tabellen III und IV und Abb. 2.

Tabelle III.

Hund Molli, ♀, etwa 10 kg, d. 23. Juli 1924. Verhalten des B. Z.-Spiegels nach Brennesselsekretininjektion.

Zeit der Blutentnahme	Blutzucker in Proz.	B. Z.-Steigerung um
10h 15′	0,068	—

10 Uhr 30 Minuten 20 ccm (= 20 g Blättertrockensubstanz) Brennesselsekretin (junge Blätter) subkutan.

Zeit der Blutentnahme	Blutzucker in Proz.	B. Z.-Steigerung um
11h 15′	0,078	0,010

Tabelle IV.

Hund Molli, ♀, etwa 10 kg, d. 25. Juli 1924. Verhalten des B. Z.-Spiegels nach Spinatsekretininjektion.

Zeit der Blutentnahme	Blutzucker in Proz.	B. Z.-Steigerung um
10h 15′	0,069	—

10 Uhr 30 Minuten 20 ccm (= 20 g Blättertrockensubstanz) Spinatsekretin (junge Blätter) subkutan.

Zeit der Blutentnahme	Blutzucker in Proz.	B. Z.-Steigerung um
11h 15′	0,075	0,006

Abb. 2. Verhalten des Blutzuckerspiegels beim normalen Hunde nach Pflanzensekretininjektionen.

Diskussion der experimentellen Befunde.

Fassen wir die Ergebnisse der oben besprochenen Versuche zusammen, so ergibt sich *eine obligatorische Steigerung der B. Z.-Kurve nach Sekretininjektion.* Diese unzweifelhafte *Sekretinhyperglykämie* stellt sich nach einer Latenzperiode allmählich ein, so daß sie ihren Maximalpunkt (bei den Tauben) 1½ bis 2 Stunden nach der Sekretininjektion erreicht. Die physiologische Aktivität des Sekretins kommt bei den excito-sekretorischen Drüsenvorgängen (Magen, Leber, Pankreas) viel rascher zum Vorschein; unentschieden bleibt dabei, ob diese Wirkung an die Sekretinsubstanz selbst oder an Begleitstoffe geknüpft ist. Über den Wirkungsmechanismus können wir nur Vermutungen hegen. Eine Mitwirkung der Leber wird wohl in erster Linie in Betracht zu ziehen sein, da auch durch andere Autoren Beziehungen zwischen den Sekretinsubstanzen und der Leber gefunden wurden. Die wichtigsten hierhergehörigen Beobachtungen stelle ich im folgenden kurz zusammen.

Nach *Schweizer* (11) wird das im Spinathydrolysat enthaltene Sekretin bei intragastraler Zufuhr entweder überhaupt nicht resorbiert, oder es wird resorbiert, aber in der Leber weitgehend zurückgehalten. *Djenab* (12, 13) konstatierte bei Tierversuchen nach verschiedenen intravasculären Sekretinapplikationen einen deutlichen Unterschied in der Sekretionsintensität. Im Gegensatz zur kräftigen Wirkung der Sekretininjektion in eine Vene des großen Kreislaufs fand er bei Einspritzung in eine Mesenterialvene eine abgeschwächte Pankreassekretion. Er kam zu denselben Resultaten auch bei intraarteriellen Sekretineinspritzungen. Der Autor deutet seine Versuchsresultate im Sinne eines hemmenden Einflusses der Leber auf das Sekretin. Die Leber regelt durch eine entsprechende Sekretinabnahme die Sekretion des Pankreas. *Halliburton* und *Souza* (14) konstatierten gleichfalls eine Auslösung der äußeren Pankreassekretion bei Injektion von Schleimhautsekretion in die Vena porta. Diese Sekretion war aber geringer

als die entsprechende bei Injizierung in die Vena jugularis. Sie erklären die Intensitätsunterschiede in den beiden Fällen durch die größere Verdünnung der injizierten Substanz infolge des zurückzulegenden Weges. *Matsuoka* (15) stellte bei künstlicher Durchblutung von überlebenden Kaninchenlebern mit sekretinhaltiger Ringerlösung eine Retention des Sekretins in der Leber fest. Die ausströmende Flüssigkeit wurde nach Einengen und Enteiweißen auf ihre sekretorische Wirksamkeit an Hunden mit permanenter Magenfistel oder *Pawlow*schem Blindsackmagen geprüft. Es zeigte sich, daß das Duodenalsekretin völlig und das Spinatsekretin erheblich aus der Durchströmungsflüssigkeit eliminiert wird.

Andererseits ist durch eine Reihe von experimentellen Untersuchungen in unserem Laboratorium gezeigt worden, daß nach subkutanen, sowie auch nach intravenösen Injektionen (periphere Vene!) von Pflanzensekretinen die excitosekretorische Drüsenleistung der Magenschleimhaut, der Leber und des Pankreas hochgradig gesteigert wird. [*Bickel* (16), *Eisenhardt* (17), *Kisseleff* (18), *Kobzarenko* (19), *Watanabe* (20), *Schimizu* (21), *Dobreff* (l. c. 9) (22)]. Dagegen ist bei peroraler Applizierung desselben Sekretins kaum eine Beeinflussung der äußeren Sekretion zu beobachten. [*Kobzarenko* (l. c. 19), *Schweitzer* (l. c. 11)].

Anschließend an diese Untersuchungen habe ich an *Pawlow*-Hunden auch Pflanzensekretine per anum gegeben. (Die Sekretin enthaltende Flüssigkeit wurde mittels eines dünnen Gummischlauchs und der Spritze ins Rektum des nüchternen Pawlowhundes eingespritzt.) Es stellte sich auch bei diesen Versuchen keine Veränderung in dem Verlauf der Magensekretionskurve ein.

Die fehlende Beeinflussung der äußeren Sekretion bei peroraler Zufuhr von Sekretin läßt sich vielleicht nicht *nur* durch langsame Resorption vom Magendarmtraktus erklären. Man muß auch noch an andere Faktoren denken. Es scheint uns, daß *die Leber im Mittelpunkt der Sekretionshindernisse steht.* Wir wollen annehmen, derjenige Teil des Sekretins, der bei der peroralen Zufuhr durch die Darmresorption ins Blut gelangt, werde mittels der Pfortader der Leber zugeführt, und erst hier werde die physiologische Aktivität des Sekretins vermindert oder aufgehoben. Vielleicht häufen die Leberzellen das Sekretin in ihrem Leibe an — wie das für die verschiedensten Alkaloide schon nachgewiesen ist —, zerstören es zum Teil und führen es zum Teil durch die Galle in den Darm wieder aus.

Wenn wir jetzt wieder zu den Veränderungen in der B. Z.-Kurve zurückkehren, die sich nach Sekretininjektion einstellen, dann entsteht *die Frage nach der Entstehungsweise der Sekretinhyperglykämie.* Bei meinen Versuchen wurde jede alimentäre hyperglykämische Mitwirkung ausgeschaltet, da die Versuchstiere immer 15 bis 20 Stunden vor der Injizierung des Sekretins nüchtern waren. Auch die applizierten Pflanzensekretinlösungen gaben keine positive Zuckerprobe, sie waren also zuckerfrei. Da sie durch Kochen mit 5proz. Schwefelsäure hergestellt waren, konnten auch kaum andere glucosegebende Substanzen mehr darin sein. Der Charakter unserer Sekretinhyperglykämie muß also nicht als alimentär betrachtet werden. Hier können wir von Hyperglykämie nach voraufgehender Nahrungsaufnahme nicht sprechen,

wie das z. B. *Tadenuma* (23) nach Applizierung von Blutgiften konstatierte. Er fand, daß solche Gifte (Phenylhydrazin, Saponin) nur nach einer vorausgehenden Nahrungsaufnahme Hyperglykämie in nennenswertem Umfang bewirken. Es muß sich also bei unserer *Sekretinhyperglykämie* der intermediäre K. H.[1])-Stoffwechsel beteiligen. Hier können verschiedene Momente in Betracht kommen, von denen aber die Beteiligung des Glykogens zweifellos im Mittelpunkt steht. So fanden *Abelous* und *Soula* (24) nach Applizierung von Schleimhautsekretin gleichzeitig mit der Steigerung des B. Z.-Spiegels [in einem Versuch von 1,4 Proz. auf 1,9 Proz. (15 Minuten post injekt.)] auch einen beträchtlichen Sturz des Leberglykogengehalts (von 2,88 auf 0,96!). Wir können aber vielleicht auch annehmen, daß die Sekretinwirkung nicht nur spezifisch für das Leberglykogen ist, sondern daß das Sekretin wohl die sämtlichen Glykogenreserven im Organismus in Mitleidenschaft zieht.

So ergibt sich also im Rahmen des intermediären K. H.-Stoffwechsels ein Parallelismus zwischen Sekretin und Adrenalin. Es ist aber interessant, daß diese Synergisten betreffs intermediärer Zellstoffwechselvorgänge auch gleichzeitig Antagonisten gegen die excitosekretosischen Drüsenzellenleistungen sind. (So z. B. bei der äußeren Sekretion des Magens bewirkt das Adrenalin eine ausgesprochene Hemmung, das Sekretin dagegen eine hochgradige Steigerung.)

Ein wenn auch nicht so großer Teil des gesteigerten B. Z.-Gehalts bei sekretinisierten Tieren ist vielleicht auch durch die sich in solchen Fällen einstellende Dehydration des Blutes bedingt. [*Dobreff* (25)].

Ähnlich den entgegengesetzten Wirkungen von Adrenalin und Sekretin verhalten sich Sekretin und Insulin in ihrer physiologischen Aktivität gegensätzlich. Hier haben wir auch einen direkten Antagonismus zwischen Insulin und Sekretin im Sinne einer allgemeinen Glykogenfixation durch das erstere. Dagegen sind Insulin und Sekretin bei der äußeren Lebersekretion Synergisten [*Brugsch* und *Horsters* (26), *Watanabe* (l. c. 20), *Dobreff* (l. c. 22) (27)].

Durch diese gegenseitige antagonistische Wirkung des Sekretins einerseits und des Insulins andererseits wird vielleicht teilweise das innere Gleichgewicht des intermediären K. H.-Stoffwechsels mit reguliert.

Zusammenfassung.

Der hyperglykämische B. Z.-Spiegel bei avitaminotischen Tauben wird durch Spinatsekretininjektion, wie auch *Abelous* und *Soula* (l .c. 24) (bei normalen Tieren nicht Tauben) nach Schleimhautsekretininjektionen

[1]) K. H. = Kohlenhydrat.

fanden, hochgradig gesteigert. Der Maximalpunkt wird in 1½ bis 2 Stunden nach der Injektion erreicht.

Auch bei normalen Tieren (Taube, Hund) wird der Blutzucker durch Spinat- bzw. Brennesselsekretinwirkung, — wenn auch nicht so intensiv — gesteigert.

Peranale Applizierung von Pflanzensekretinen ruft keine Magensaftsekretion bei nüchternen Tieren hervor.

Im intermediären K. H.-Stoffwechsel erscheint der Wirkungsmechanismus des Sekretins entgegengesetzt zu dem des Insulins zu sein.

Literatur.

1) *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauss*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 45, 1923. — 2) *Laqueur*, Verlag von Bergmann, 1925. — 3) *Bickel* und *Collazo*, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 45, 1923. — 4) *Collazo*, *Händel* und *Rubino*, Klin. Wochenschr. Nr. 8, 1924; Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 23, 1924. — 5) *van Eweyk*, Virchows Arch. **227**, 1920. — 6) *Uhlmann*, Zeitschr. f. Biol. **68**, H. 10, 11 und 12, 1918. — 7) *Onohara*, diese Zeitschr. **157**, H. 3/4, 1925. — 8) *Collazo*, ebendaselbst **184**, 1922; **186**, 1923. — 9) *Dobreff*, Münch. med. Wochenschr. Nr. 24, 1924. — 10) *Derselbe*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 28, 1924. — 11) *Schweizer*, diese Zeitschr. **107**, 1920. — 12) *Djenab*, Ann. de méd. **12**, Nr. 6, 1922. — 13) *Derselbe*, Berl. klin. Wochenschr. 1917, S. 624. — 14) *Halliburton* und *Souza*, Arch. intern. de physiol. **18**, 1921. — 15) *Matsuoka*, diese Zeitschr. **186**, H. 4/6, 1923. — 16) *Bickel*, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 3, 1917. — 17) *Eisenhardt*, ebendaselbst Nr. 23, 1917; Internat. Beitr. Ernährungsstörungen 1910. — 18) *Kisseleff*, ebendaselbst **3**, 1912. — 19) *Kobzarenko*, ebendaselbst **5**, 1915. — 20) *Watanabe*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **40**, 1924. — 21) *Schimizu*, diese Zeitschr. **149**, H. 5/6, 1924. — 22) *Dobreff*, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Brennesselsekretins auf die Gallensekretion, Zeitschr. f. ges. exper. Med. (im Druck). — 23) *Tadenuma*, diese Zeitschr. **141**, H. 1/3, 1923. — 24) *Abelous* und *Soula*, C. r. hebd. de séan. d. l'acad. d. scien. **170**, Nr. 12, 1920. — 25) *Dobreff*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. **44**, H. 3/4, 1925. — 26) *Brugsch* und *Horsters*, Med. Klinik Nr. 20, 1924. — 27) *Dobreff*, diese Zeitschr. **154**, H. 3/6, 1924.

Zur Kenntnis der Metallsalzwirkung auf die H_2O_2-Zersetzung durch Blut.

Von

Leo Bleyer.

(Aus dem staatlichen Seruminstitut in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 6. Juni 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Beeinflussung fermentativer Prozesse durch die Anwesenheit von Metallsalzen war schon seit langem Gegenstand zahlreicher und eingehender Untersuchungen, deren Bedeutung sich im wesentlichen von zwei Gesichtspunkten aus verstehen läßt: Vom rein chemischen Standpunkt aus bietet die Erforschung der Salzwirkung neue Möglichkeiten, um in die Eigenart der Fermentnatur weitere Einblicke zu gewinnen; für die physiologische Betrachtungsweise ist die Überlegung maßgebend, daß den Salzen, von denen sich ein Teil in niedrigen Konzentrationen in den Körpersäften und Geweben findet, die Rolle von Regulatoren für die enzymatischen Leistungen des Organismus zukommen kann und ihre Bedeutung für die Kräftesynergie des Körpers keine bloß nutritive, sondern auch funktionelle ist.

Eine Sichtung älterer und neuerer Ergebnisse auf diesem Gebiet findet sich bei *Oppenheimer* (1) und *Euler* (2). Hinsichtlich der Katalasen ist hervorzuheben, daß bei denselben von früheren Untersuchern im Gegensatz zu anderen Fermenten, bei welchen nebst hemmenden auch stimulierende Wirkungen gefunden wurden, fast ausschließlich Vergiftungen durch die Salze zur Beobachtung kamen. Sowohl die Anionen als auch die Kationen wurden mehrfach auf ihre Hemmung hin untersucht. Bei der Anionenvergiftung fanden *Michaelis* und *Pechstein* (3) für die Leberkatalase die Reihe $SO_4 < Cl <$ Acet. $< NO_3$ (Zunahme der Hemmung von links nach rechts), welche ihre Bestätigung in weiteren Untersuchungen von *Spiro* (4) für die Blutkatalase, von *Santesson* (5) für die Froschmuskelkatalase ($SO_4 < PO_4 < Fl < Br < J < CO_3 < Cl < ClO_3 < NO_3 < CN$) und *Smirnow* und *Alissowa* (6) für die Weizensamenkatalase ($SO_4 < PO_4 < Cl < NO_3$) fand. Bei Katalasen verschiedener Herkunft ergab sich also im wesentlichen dieselbe Anionenempfindlichkeit. Hinsichtlich der Kationenwirkung sei insbesondere auf die Arbeiten von *Favre* (7), *Spiro* (4), *Rona* und *Damboviceanu* (8), *Funk* (9),

Santesson (5), *Yamasaki* (10) und *Smirnow* und *Alissowa* (6) verwiesen. Bei letztgenannten Autoren findet sich das erstemal eine genaue Berücksichtigung der durch Metallsalze hervorgerufenen Änderung der Wasserstoffionenkonzentration in den Reaktionsgemischen, nachdem bereits früher *Abderhalden* und *Fodor* (11) in ihrer Studie über den Abbau von Dipeptiden durch Hefeauszug dasselbe Moment für die Beurteilung der Salzwirkung hervorgehoben hatten.

Gegenstand vorliegend mitgeteilter Versuche war der Einfluß anorganischer Salze auf die H_2O_2-Zersetzung durch Kaninchenblut, wobei fast ausschließlich ihr Kationanteil in Betracht gezogen wurde. Die Analyse der Salzwirkung gliederte sich in zwei Richtungen: 1. Als Hauptfrage wurde die Beziehung zwischen Salzeffekt und Salzmenge behandelt. 2. Als Nebenfrage wurde in orientierenden Versuchen die Fermentinaktivierung im zeitlichen Verlauf geprüft.

1. Inaktivierungs(Stimulierungs-)grad und Salzmenge.

Ein Reinigungsverfahren für Blutkatalase hat *Tsuchihashi* (12) ausgearbeitet. Für die Wahl von Vollblut oder einer gereinigten Fermentlösung war die Fragestellung entscheidend. Wenn der Fermentkinetik die Gewinnung möglichst reiner und von Beimengungen freier Enzympräparate als Ziel vorschwebt, so erscheint es im Rahmen der physiologischen Betrachtungsweise gerade von Interesse, die Fermentleistungen der Körpersäfte und Gewebe in einem von den Verhältnissen in vivo nicht allzusehr abweichenden Milieu zu untersuchen. Gewiß kann eine Auflösung von Blut in destilliertem Wasser nicht mehr als physiologische Flüssigkeit angesprochen werden; sie enthält aber noch alle gelösten Bestandteile von früher und steht in ihrem kolloidalen Verhalten dem ursprünglichen Zustand immerhin noch näher als ein durch Fällungs- und Adsorptionsprozeduren gewonnenes Fermentpräparat. Der Vorteil konstanteren Katalasegehalts und somit gleichmäßigerer Versuchsbedingungen ist für den letzteren Fall unbedingt zuzugeben. Die Schwankungen im Umsatz betrugen bei meinen Untersuchungen ungefähr 55 bis 63 Proz. der H_2O_2-Ausgangskonzentration, hielten sich also in Grenzen, die einen Vergleich der einzelnen Versuche miteinander gestatten.

Meine Versuchsanordnung gestaltete sich einfach: In einer Reihe von Erlenmeyerkölbchen kamen zu 5 ccm Salzlösung 5 ccm H_2O_2-Lösung (0,2 proz.) und 1 ccm einer Blutverdünnung, die durch Auflösung von 1 Tropfen Blut (= 0,05 ccm) in 50 ccm destillierten Wassers hergestellt worden war. Die Kontrollösung bestand aus 5 ccm destilliertem H_2O + 5 ccm H_2O_2 + 1 ccm Blutverdünnung. Nach einer Einwirkungszeit von 15 Minuten bei Zimmertemperatur wurde die Fermentwirkung in den Kölbchen möglichst rasch und in derselben Reihenfolge wie beim Blutzusatz mit etwa 10 proz. H_2SO_4 unterbrochen

und sodann mit n/100 Kaliumpermanganatlösung titriert. *Michaelis* und *Pechstein* (3) geben an, daß zwischen 0 bis 18° die Umsatzgeschwindigkeit der Katalase sehr wenig von der Temperatur abhängt. Außerdem waren innerhalb der kurzen Einwirkungszeit Temperaturschwankungen nicht zu beobachten (an gewöhnlichem Thermometer ohne $^1/_{10}$° Einteilung gemessen). Es wurde also die Fermentkonzentration konstant gehalten und in ihrer Stärke (s. o.) so gewählt, daß sowohl hemmende als auch stimulierende Metallwirkungen bei der Umsatzbestimmung hervortreten konnten. Die Salzmengen hingegen waren in den einzelnen Doppelproben abgestuft, um den Metalleffekt in seiner Abhängigkeit von der Konzentration der Salze unter sonst gleichen Bedingungen zu erfassen. Der größere Teil der Salze bestand aus Chloriden; Ag, Pb, Bi und Sr kamen als Nitrate in Anwendung, Be als Sulfat, Mo als Na_2MoO_4 und Sb als $KSbO_2$.

Wie schon beim Literaturhinweis erwähnt, reagiert ein Teil der Metallsalze mehr oder weniger stark sauer. Da die Berücksichtigung dieser Tatsache eine Modifizierung der Versuchsanordnung erforderte, sind die Ergebnisse in zwei getrennten Abschnitten mitgeteilt:

a) Salze, bei denen die p_H-Verschiebung durch die angewandten Konzentrationen innerhalb der optimalen p_H-Zone für die Katalase liegt.

Für die (Leber-)Katalase wurde von *Sörensen* (13) ein p_H-Optimum von etwa 6,1 bis 7,5 angegeben bei einer Einwirkungszeit unter 40 Minuten; mit wachsender Reaktionszeit engt sich nach seiner Kurventafel die Breite dieser Zone immer mehr ein. *Michaelis* und *Pechstein* fanden einen Bereich von 6,3 bis 7,6. Ich habe in eigenen Versuchen bei Anwendung von Phosphatpuffern zwischen p_H 6,1 bis 7,4 eine Umsatzdifferenz von 2 bis 3 Proz. im Sinne einer geringen Zunahme nach der alkalischen Seite zu gefunden, zwischen dem Phosphatgemisch 6,1 und der Wasserkontrolle überhaupt keinen Unterschied. Der p_H-Wert des destillierten Wassers betrug 6,1 bis 6,3; Zusatz von 1 ccm 1000fach verdünnter Blutlösung änderte denselben nicht. [H˙] des endgültigen Reaktionsgemisches wurde auf 6,2 geschätzt, war aber nicht genau ablesbar wegen leichter Farbveränderung des Indikators (Methylrot) durch H_2O_2. Für elektrometrische Messungen mit der Chinhydronelektrode oder der Gaskette sind H_2O_2-Lösungen bekanntlich nicht brauchbar, so daß die Bestimmung auf diesem Wege nicht gemacht werden konnte. Bei *Sörensen* und *Smirnow* und *Alissowa* findet sich die Angabe, daß sich [H˙] im Verlauf der H_2O_2-Spaltung nicht oder unwesentlich ändere. Die kolorimetrisch gemessenen p_H-Werte der stärksten angewendeten Salzkonzentrationen finden sich in Tabelle I zusammengestellt; wie daraus ersichtlich, liegen letztere alle unterhalb der bei *Sörensen* angegebenen Salzfehlergrenze für die

kolorimetrische Bestimmung (0,3 bis 0,5 n). Tabelle II enthält die Übersicht über die Salzwirkung auf die Katalase; die Umsätze sind in Prozenten des Kontrollwertes ausgedrückt und die denselben entsprechenden Salzmengen in Millimolarität des Endvolumens. Die graphische Darstellung der Umsatzveränderungen bei den Salzen, welche stärker inaktivierten, findet sich in Kurventafel 2. Die Abszisse ist aus Gründen besserer Darstellbarkeit logarithmisch transformiert; die einzelnen Konzentrationsstufen sind somit durch den Logarithmus des Molaritätsfaktors ausgedrückt (— 1 = 0,1 mol., — 1,31 = 0,05 mol. usw.). Die Ordinaten stellen die Umsätze in Prozenten des Kontrollwertes dar.

Tabelle I.

LiCl m/10	NaCl m/10	KCl m/10	RbCl m/20	CsCl m/20	$CaCl_2$		$MgCl_2$ m/10
					m/10	m/20	
6,3	6,1	6,2	6,7	6,6	7,4	6,55	6,3

$BaCl_2$ m/10	$Sr(NO_3)_2$ m/10	$AgNO_3$ m/100	$MnCl_2$ m/10	$CoCl_2$ m/20	$NiCl_2$ m/20	$KSbO_2$ m/100	Na_2MoO_4 m/50
6,3	6,2	6,2	6,2	6,1	6,1	6,55	6,8

Tabelle II.

Millimol	LiCl Proz.	NaCl Proz.	KCl Proz.	RbCl Proz.	CsCl Proz.	$CaCl_2$ Proz.	$MgCl_2$ Proz.	$BaCl_2$ Proz.	$Sr(NO_3)_2$ Proz.	$MnCl_2$ Proz.	$CoCl_2$ Proz.	$NiCl_2$ Proz.	$AgNO_3$ Proz.	$KSbO_2$ Proz.
100	82	89	90	—	—	48	28	84	46	—	—	35	—	—
50	86	95	95	88	92	54	45	—	48	20	48	37	—	—
10	95	98	100	95	98	74	78	98	51	50	57	68	11	10
5	98	100	100	98	100	80	88	100	—	76	65	80	17	10
1	100	100	100	100	100	92	98	100	60	90	86	96	28	28
0,5	—	—	—	—	—	100	100	—	68	96	91	98	36	37
0,1	—	—	—	—	—	100	100	—	86	100	96	100	52	68
0,05	—	—	—	—	—	100	100	—	95	100	100	100	71	90
0,01	—	—	—	—	—	100	100	—	100	100	100	100	85	98
0,005	—	—	—	—	—	100	100	—	100	100	100	100	90	100
0,001	—	—	—	—	—	100	100	—	100	100	100	100	98	100

Bei Betrachtung der Metallwirkung ist sowohl das Ausmaß der Umsatzveränderung an sich; als auch die Art und Weise, *wie* dieselbe bei fallenden Salzmengen verläuft, zu berücksichtigen. In dem untersuchten Bereich von 100 (50) bis 0,001 Millimol waren keine stimulierenden Wirkungen, wohl aber bei allen Salzen mehr oder weniger *hemmende* Einflüsse zu beobachten. Diese Hemmung ist bei den bivalenten Verbindungen (ausgenommen $BaCl_2$) bedeutend stärker aus-

geprägt als bei der monovalenten Gruppe der Alkalimetalle. Letztere zeigen untereinander nur geringe quantitative Schwankungen. Die Giftigkeit der bivalenten Metalle hingegen weist Unterschiede zwischen den einzelnen Salzen auf (Mn > Mg > Ca > Ba; Co und Ni hemmen bei Vergleich aller Verdünnungsstufen annähernd gleich), nach denen man die Hemmung nicht als bloße Funktion der Valenz betrachten kann, sondern daneben spezifische Kationenwirkungen annehmen muß. Einen ähnlichen Befund erhoben *Smirnow* und *Alissowa* (6) für die Weizensamenkatalase. Sr und Ag nehmen eine Sonderstellung im Sinne der Nitratvergiftung ein. Daß die Hemmung durch diese beiden Salze jedoch nicht allein durch den Säurerest bedingt ist, geht aus dem erheblichen Wirkungsunterschied zwischen beiden hervor, der eine spezifische Giftigkeit des Ag-Kations erkennen läßt. Starke Hemmung zeigte auch $KSbO_2$, welche angesichts der Indifferenz von Kalium in der untersuchten Konzentrationszone dem Sb bzw. SbO_2 zugeschrieben werden muß.

Tabelle III.
Die Kinetik der Na_2MoO_4-Katalyse.

Mol	t Min.	x Proz.	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{1}{t} \cdot \frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$	$\frac{1}{t} \cdot \frac{a}{a(a-x)}$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
	15	31	0,010 65	0,001 23	0,000 957	8,0
	30	51	0,010 21	0,001 41	0,000 671	9,2
	45	61	0,008 98	0,001 34	0,000 563	9,1
	60	69	0,008 13	0,001 39	0,000 512	8,8
	75	74	0,007 85	0,001 15	0,000 532	8,5
	90	78	0,007 29	0,001 24	0,000 506	8,2
	10	23	0,011 06	0,001 49	0,001 290	7,1
	20	39	0,011 34	0,001 41	0,000 820	8,6
	30	47	0,009 54	0,001 22	0,000 620	8,5
	40	56	0,008 61	0,001 12	0,000 555	8,8
	50	61	0,008 16	0,001 20	0,000 513	8,6
	20	44	0,012 52	0,001 66	0,001 201	9,7
	30	56	0,011 74	0,001 70	0,000 749	10,0
	45	63	0,009 49	0,001 46	0,000 590	9,4
	60	69	0,008 12	0,001 28	0,000 512	8,8
	75	72	0,007 18	0,001 15	0,000 482	8,2
	90	76	0,006 62	0,001 14	0,000 444	8,0

Na_2MoO_4 wirkt für sich allein katalytisch. In die Kinetik seiner H_2O_2-Spaltung gewährt Tabelle III Einblick. Man ersieht daraus, daß die Konstanten erster und zweiter Ordnung stark sinken und daß sich der zeitliche Verlauf der Spaltung am ehesten durch die *Schütz*sche Regel $\left(\frac{x}{\sqrt{t}}\right)$ oder die von *Morgulis* (14) als anderthalbmolekular bezeichnete Formel ausdrücken ließe, was der Annäherung an ein *parabelförmiges Zeitgesetz* entsprechen würde.

Tabelle IV.

x_1 und x_2 = H_2O_2-Umsatz im Kaliumpermanganatäquivalent ausgedrückt.

Millimol:	20	10	5	2	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
Na_2MoO_4 (x_1)	15	15	10	6,5	3,7	3,0	1,8	0	0	0
Na_2MoO_4+Katalase (x_2)	22	23	23	23	23	23,5	25,5	28	28	28
$x_2 - x_1$	7	8	13	16,5	19,3	20,5	23,7	28	28	28
$x_2 - x_1$ in Kontr.-Proz.	25	29	47	60	70	75	88	100	100	100

Das Zusammenwirken von Blutkatalase und Na_2MoO_4 bei konstanter Zeit und fallenden Salzmengen ist in Tabelle IV wiedergegeben. Die wahre Giftigkeit des Molybdänsalzes leuchtet erst hervor, wenn

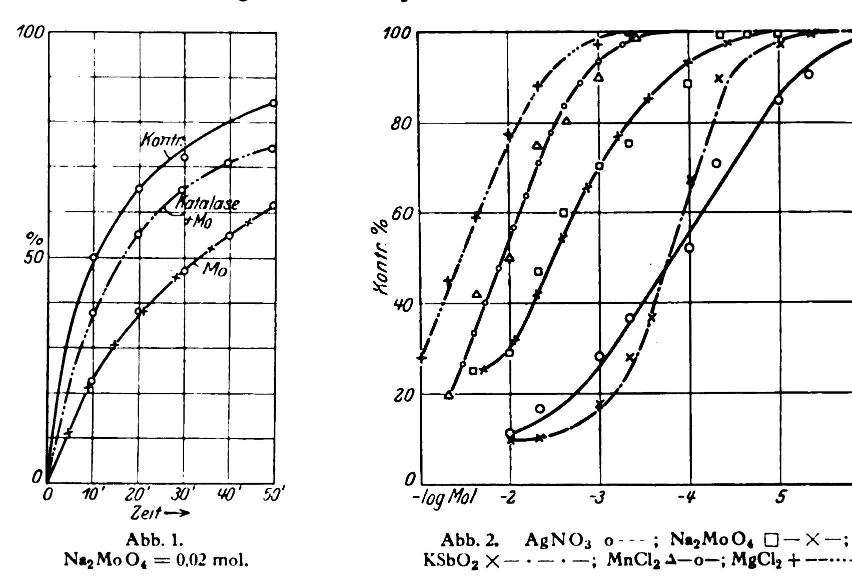


Abb. 1. Na_2MoO_4 = 0,02 mol.

Abb. 2. $AgNO_3$ o---; Na_2MoO_4 □—×—; $KSbO_2$ ×—·—·—; $MnCl_2$ Δ—o—; $MgCl_2$ +—···—

man den reinen Metalleffekt von dem sich aus dem Zusammenwirken von Ferment und Salz ergebenden in Abzug bringt. Katalase und Salz wirken nicht in additivem Sinne zusammen, sondern die Kombinationswerte liegen bis 0,05 Millimol tiefer als der Kontrollwert infolge Interferenz der katalytischen mit der fermenthemmenden Komponente. Noch anschaulicher treten diese Verhältnisse im zeitlichen Verlauf (Kurventafel 1) hervor.

Den Verlauf der Fermentinaktivierung in seiner Abhängigkeit von der Salzmenge illustriert die graphische Reproduktion (Kurventafel 2). Die Kurven lassen ein geradliniges nach der Breite der Hemmungszone mehr oder weniger steiles Mittelstück erkennen, welches an beiden Enden in bogenförmiger Krümmung der Horizontalen zustrebt, d. h. nach oben die den Kontrollwert repräsentierende Hori-

zontale und nach unten bei totaler Inaktivierung (siehe Kurventafel 3) die Abszisse, bei partieller eine dazu parallele Linie erreicht. Die Verbindung der den einzelnen Salzmengen entsprechenden Ordinatenwerte führt demnach zu einer Konfiguration, welche die Merkmale einer *Dissoziationskurve* erkennen läßt. Die Hemmungskurven von $MnCl_2$, $MgCl_2$ und $CdCl_2$ (Abb. 3) lassen sich zwanglos als Teilstrecken einer solchen betrachten, deren Fortsetzung nach unten gegen die Abszisse oder eine dazu parallele Horizontale in den nicht untersuchten stärkeren Konzentrationen liegen würde. *Euler* und *Svanberg* (2) fanden für die Inaktivierung der Sacharase durch $HgCl_2$ dasselbe Verhalten und deuteten es im Sinne einer Komplexsalzbildung zwischen Ferment und Metallsalz.

b) Salze mit einer p_H-Verschiebung nach der sauren Seite über den optimalen Grenzwert (6,1) hinaus.

Eine Nichtberücksichtigung dieser Erscheinung würde Giftwirkungen vortäuschen, welche auf einer Versäuerung der Reaktionsgemische beruhen oder mindestens kein Urteil darüber gestatten, inwieweit die beobachtete Inaktivierung Ausdruck der [H˙]-Änderung oder des reinen Metalleffektes ist. In Tabelle V sind die p_H-Werte für verschiedene Verdünnungsstufen der untersuchten Salze zusammengestellt. Die Ermittelung derselben erfolgte auf kolorimetrischem Wege mit den Indikatoren Thymolblau (p_H 1,2 bis 2,8), Bromphenolblau (p_H 3 bis 4,6) und Methylrot (p_H 4,4 bis 6,2); die in Klammern gesetzten

Tabelle V.

p_H-Werte der sauer reagierenden Metallsalze in verschiedenen Konzentrationen.

Millimol	$AlCl_3$	$BeSO_4$	$HgCl_2$	$CdCl_2$	$Bi(NO_3)_3$	$Pb(NO_3)_2$	$FeCl_3$	$RhCl_3$	$ZrCl_4$	$CeCl_3$	$TiCl_4$	$LaCl_3$
10	3,7 (3,76)	3,7	4,6	5,6	—	5,5	—	—	—	5,6	1,7	5,9
5	3,8	3,8	—	6,0	—	5,8	—	—	—	5,9	1,9	6,0
2	—	3,9	—	6,1	—	—	—	—	2,4	6,0	2,3	6,1
1	4,3	4,3 (4,87)	5,2	—	1,9 (2,06)	6,0	2,6 (2,53)	2,8	2,9 (3,05)	6,1	2,5	6,2
0,5	4,4	4,7	5,4	—	2,4	6,2	3,0	3,2	3,5	—	2,8	—
0,2	4,8	—	5,5	—	—*)	—	—	5,4	5,2	—	3,1	—
0,1	5,5	5,9	5,6	—	—*)	—	3,4	5,8	5,5	—	3,6	—
0,05	—	6,1	5,8	—	—*)	—	3,6	6,0	6,0	—	5,4	—
0,02	6,0	—	6,1	—	—*)	—	—	6,1	6,1	—	6,0	—
0,01	6,2	—	—	—	5,2	—	5,9	—	—	—	6,2	—
0,005	—	—	—	—	5,8	—	6,1	—	—	—	—	—
0,002	—	—	—	—	6,0	—	—	—	—	—	—	—

Zwischen p_H 3,0 und 4,4 nicht meßbar wegen Reduktion des Indikators (Bromphenolblau). Mit Methylrot unter 4,4 bestimmt.

fettgedruckten Zahlen bedeuten elektrometrische Kontrollmessungen mit der Chinhydronelektrode, die *O. M. Henriques* ausführte. Die Übereinstimmung zwischen den kolorimetrischen und den elektrometrischen Werten ist eine gute. Wenn *Berczeller* (15) meint, daß der Farbenumschlag des Methylrots durch Eisenchloridspuren auf einer Dispersitätsänderung des Indikators beruhen könne in Analogie mit den Farbveränderungen, welche kolloidale Lösungen bei Dispersitätsänderungen erleiden, so ist durch die elektrometrische Verifizierung der kolorimetrischen Ablesung wohl die saure Reaktion der Salzlösung als Ursache des Farbenumschlages erwiesen. Der stark saure Charakter der meisten in Tabelle V angeführten Salzlösungen läßt die Größe des Fehlers, der durch seine Ignorierung entstünde, ermessen. Um diesen Fehler zu beseitigen, war es notwendig, alle Proben auf dieselbe [H˙] zu bringen. Diese Einstellung erfolgte durch vorher ausprobierte Rücktitration mit n/10 bis n/50 NaOH auf etwa p_H 6,2. Ein Teil der Salze fiel dabei in Form von Hydroxyden aus und konnte innerhalb der Fällungszone nicht untersucht werden. Die unterhalb derselben noch auftretenden Hemmungen gestatten aber einen Rückschluß auf die Giftigkeit größerer Mengen zu ziehen. Tabelle VI enthält die Übersicht über die bei den einzelnen Salzen gefundenen Hemmungen. Von den bivalenten Verbindungen zeigt Hg eine spezifisch starke Giftigkeit, während Be sich jenseits der Fällungszone indifferent verhält und Cd ungefähr dem Ca (Tabelle II) gleich kommt. Bei Pb und Bi ist bei Vergleich mit den anderen Salzen auch die Giftigkeit des Säurerestes mit in Rechnung zu ziehen ($NO_3 > Cl$). Die tri- und tetravalenten Salze inaktivieren stark mit Ausnahme von $RhCl_3$ und $AlCl_3$, welch letzteres sich im untersuchbaren Verdünnungsbereich als ungiftig erwies. Eine genauere Beziehung zwischen Valenz und Giftigkeit ist jedenfalls nicht heraus-

Tabelle VI.

Millimol	$BeSO_4$ *) Proz.	$HgCl_2$ Proz.	$CdCl_2$ *) Proz.	$Pb(NO_3)_2$ *) Proz.	$Bi(NO_3)_3$ *) Proz.	$RhCl_3$ Proz.	$CeCl_3$ Proz.	$LaCl_3$ Proz.	$AlCl_3$ *) Proz.	$ZrCl_4$ *) Proz.	$TiCl_4$ *) Proz.
50	—	—	51	—	—	—	0	—	—	—	—
10	—	0	77	—	—	—	20	27	—	—	—
5	—	0	82	—	—	—	32	30	—	—	—
1	100	0	94	13	—	92	59	47	100	—	—
0,5	100	3	98	18	—	98	68	59	100	85	85
0,1	100	36	100	34	21	100	89	79	100	93	98
0,05	100	62	100	48	56	100	100	96	100	96	100
0,01	100	92	100	70	80	100	100	100	100	100	100
0,005	—	100	100	95	91	100	100	100	100	100	100
0,001	—	100	100	98	99	100	100	100	100	100	100

*) Sichtbare Ausfällung in den nicht untersuchten Konzentrationsstufen beim NaOH-Zusatz.

zulesen; wenn sie besteht, so ist sie eben überdeckt und durchbrochen von spezifischen Metallwirkungen, wie wir das teilweise schon bei Tabelle II sahen. Die graphische Darstellung der Enzyminaktivierung enthält Kurventafel 3. Die Hemmungskurven zeigen die schon früher besprochene Konfiguration einer Dissoziationskurve.

$FeCl_3$ wirkt bekanntlich selbst stark katalytisch. Der zeitliche Verlauf seiner Katalyse ist in verschiedenen Konzentrationen durch die monomolekulare Konstante gut ausdrückbar, entspricht also einer *logarithmischen Funktion* (Tabelle VII). Das Zusammenwirken mit Blutkatalase in einer Konzentration von 2 Millimol ist in Kurventafel 4

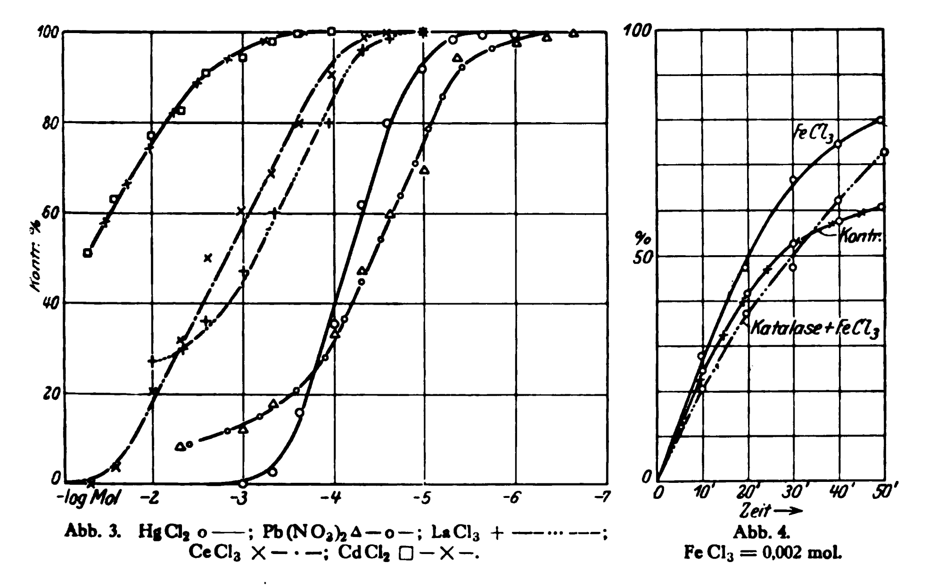


Abb. 3. $HgCl_2$ o ——; $Pb(NO_3)_2$ Δ—o—; $LaCl_3$ + —— ··· ——; $CeCl_3$ × — · —; $CdCl_2$ □ — × —.

Abb. 4. $FeCl_3 = 0{,}002$ mol.

wiedergegeben. Bei Ausdeutung der Kombinationskurve ist von einer Fermentleistung ganz abzusehen, da der p_H-Wert einer 0,002 mol. $FeCl_3$-Lösung unter 2,53 liegt (Tabelle V) und in so saurem Milieu eine Katalaseleistung überhaupt nicht zustande kommt. Sie ist also Aus-

Tabelle VII.

Die Kinetik der $FeCl_3$-Katalyse.

0,01 mol (0,5 Proz. H_2O_2)			0,005 mol (0,1 Proz. H_2O_2)			0,002 mol (0,1 Proz. H_2O_2)		
Min.	x Proz.	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	Min.	x Proz.	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	Min.	x Proz.	$\frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$
5	30	0,031 06	10	61	0,040 82	10	28	0,014 30
15	75	0,039 75	20	86	0,042 71	20	48	0,015 05
20	82	0,037 21	30	95	0,042 93	30	68	0,015 41
30	91	0,034 56	40	98	0,042 47	40	75	0,015 05

druck reiner $FeCl_3$-Katalyse und die gegenüber dem System H_2O_2 + $FeCl_3$ verringerten Umsätze sind durch eine teilweise Bindung des Salzes an die in der zugesetzten Blutlösung enthaltenen Eiweißspuren erklärbar. Zur weiteren Analyse der $FeCl_3$-Wirkung war eine andere Versuchsanordnung notwendig. Wenn früher alle Salzproben durch Rücktitration mit NaOH ($FeCl_3$ fällt hierbei als braunes Hydroxyd aus) auf die [H˙] der Kontrolle gebracht wurden, so wurde jetzt umgekehrt jede einzelne Salzprobe mit einer Kontrollösung verglichen, die mittels Citratmischungen auf die [H˙] der Salzlösung eingestellt war. Jeder Konzentrationsstufe entsprach also eine eigene Kontrolle derselben [H˙], an der allein ihr Umsatz zu beurteilen war. Hingegen ist ein Vergleich der verschiedenen Salzproben untereinander nicht möglich, da innerhalb der Verdünnungsreihe sowohl p_H als auch die Salzmenge variierten. Nach dieser Methode wurden außer dem $FeCl_3$ noch $AlCl_3$ und $BeSO_4$, die sich beide früher als ungiftig erwiesen hatten, untersucht; die Resultate enthält Tabelle VIII. Betrachten wir zunächst das $FeCl_3$: bis 0,5 Millimol sinken die Kombinationswerte proportional den reinen $FeCl_3$-Werten, aber absolut etwas erniedrigt, sowie es sich bereits im Zeitversuch gezeigt hatte, während die Kontrolleistung Null ist. Ab 0,1 Millimol wirkt $FeCl_3$ innerhalb der kurzen Einwirkungsdauer von 15 Minuten nicht mehr katalytisch und die Kontrolle (p_H 3,4) beginnt H_2O_2 zu zersetzen. Die Kombinationswerte sind aber bis einschließlich 0,01 Millimol bedeutend höher, das $FeCl_3$ wirkt also in der Zone von 0,1 bis etwa 0,01 deutlich *stimulierend*. Eine starke Stimulierung bis 0,5 Millimol zeigt auch $BeSO_4$, bei $AlCl_3$ ist sie geringer ausgesprochen. Daß diese Förderung der Enzymleistung durch Be und Al in den früheren Versuchen mit Rücktitration (Tabelle VI) nicht in Erscheinung

Tabelle VIII.

$BeSO_4$, $AlCl_3$ und $FeCl_3$ *ohne* Rücktitration. Die Umsätze in Prozenten der Ausgangskonzentration ausgedrückt. Für jede Salzkonzentrationsstufe eine eigene Kontrolle von ungefähr derselben [H˙].

$BeSO_4$				$AlCl_3$				$FeCl_3$				
Millimol	p_H	Kontrolle Proz.	+ Salz Proz.	Millimol	p_H	Kontrolle Proz.	+ Salz Proz.	Millimol	p_H	Kontrolle Proz.	+ Salz Proz.	$FeCl_3$ allein Proz.
50	3,4	2	**15**	10	3,6	10	18	10	—	—	46	49
10	3,7	7	**59**	5	3,8	13	28	5	—	—	40	47
5	3,8	12	**70**	1	4,3	41	56	1	2,5	—	12	17
2	3,9	20	**79**	0,5	4,4	50	**61**	0,5	3,0	0	10	14
1	4,3	44	**83**	0,1	4,9	79	75	0,1	3,4	1	**40**	0
0,5	4,7	71	**85**	0,05	5,5	87	84	0,05	3,6	3	**45**	—
0,1	5,9	91	91	—	—	—	—	0,01	5,9	53	59	—
—	—	—	—	—	—	—	—	0,005	6,2	61	60	—
—	—	—	—	—	—	—	—	0,001	6,2	61	61	—

trat, dürfte auf der Bildung undissoziierter Hydroxyde durch den NaOH-Zusatz, deren Ausfällung makroskopisch nicht zu sehen war, beruht haben.

2. Die Inaktivierung der Blutkatalase durch Salze im zeitlichen Verlauf.

Außer der Beziehung zwischen Hemmungsgrad und Salzmenge war noch eine Orientierung in der Frage von Interesse, ob a) unter dem Einfluß der Salzvergiftung das Zeitgesetz der Katalase verändert wird und b) ob in substratfreiem Milieu die Enzyminaktivierung allmählich spontan zurückgeht. Eine derartige Selbstregeneration der Metallvergiftung hat *Euler* (2) am $HgCl_2$ für die Sacharase nachgewiesen.

a) Die Kinetik der Katalase ist in neueren Arbeiten unter anderem von *Morgulis* (14) studiert und von *Rona* und *Damboviceanu* (8) nachgeprüft worden. Es wurde gefunden, daß der Gang der Spaltung vom jeweiligen Mengenverhältnis Ferment-H_2O_2 abhängt. Bei fast totaler Spaltung ergab sich die Gültigkeit des monomolekularen Zeitgesetzes, bei einem Umsatz zwischen etwa 60 bis 80 Proz. ein bimolekularer Verlauf und bei dazwischenliegenden Spaltungswerten eine Funktion nach der Formel $\frac{1}{t} \cdot \frac{\sqrt{a} - \sqrt{a-x}}{\sqrt{a\,(a-x)}}$, die *Morgulis* anderthalbmolekular nannte. *Hemmung durch Salzzusatz* (NaCl) wirkte in den Versuchen von *Rona* und *Damboviceanu* in kinetischer Hinsicht einfach so, als ob weniger Ferment vorhanden wäre, d. h. der Verlauf war ein bimolekularer.

Von mehreren in dieser Richtung ausgeführten eigenen Versuchen sind hier drei wiedergegeben (Tabelle IX). Die Konzentration des H_2O_2 im Gesamtvolumen war 0,1 proz., die des Blutes entsprach einer Verdünnung von etwa 1 : 10000; die Umsätze (x) finden sich in Prozenten der H_2O_2-Ausgangskonzentration (Kaliumpermanganatäquivalent) ausgedrückt. Ein Blick auf die Reaktionskonstanten lehrt, daß bei allen drei Salzen trotz beträchtlicher Inaktivierung [Umsatz bei $Sr(NO_3)_2$ 18 Proz., bei $LaCl_3$ 65 Proz. und $KSbO_2$ 36 Proz.] der Gang der Spaltung *annähernd anderthalbmolekular blieb* und der kinetische Effekt der Salzhemmung nicht in einer bloßen Verminderung der Fermentmenge charakterisiert werden kann, denn dann hätte die Reaktion nach den früher erörterten Umsatzregeln bimolekular vor sich gehen müssen. Vielmehr schien der Salzzusatz einer Abänderung der Zeitregel entgegenzuwirken.

b) Mit $HgCl_2$, $LaCl_3$ und $KSbO_2$ angestellte Versuche über eventuelle Selbstgeneration der Metallvergiftung, zeigten innerhalb einer Beobachtungsdauer von 45 Stunden *keinen* spontanen Rückgang der Inaktivierung.

Tabelle IX.

LaCl$_3$ (0,001 mol)					Sr(NO$_3$)$_2$ (0,01 mol)						KSbO$_2$ (0,002 mol)					
Kontrolle		+ Salz			Kontrolle			+ Salz			Kontrolle			+ Salz		
t	x Proz.	x Proz.	$\frac{1}{t}\cdot\frac{a}{a(a-x)}$	$\frac{1}{t}\cdot\frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$	t	x Proz.	$\frac{1}{t}\cdot\frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$	x Proz.	$\frac{1}{t}\cdot\frac{a}{a(a-x)}$	$\frac{1}{t}\cdot\frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$	t	x Proz.	$\frac{1}{t}\cdot\frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$	x Proz.	$\frac{1}{t}\cdot\frac{a}{a(a-x)}$	$\frac{1}{t}\cdot\frac{\sqrt{a}-\sqrt{a-x}}{\sqrt{a(a-x)}}$
10′	89	31	0,001450	0,00204	10′	55	0,00492	4,3	0,0001045	0,000214	15′	48	0,00256	9	0,000712	0,000346
20	98	44	0,000890	0,00166	20	73	0,00463	6,4	0,0000530	0,000160	30	68	0,00253	17	0,000396	0,000322
30	100	54	0,000716	0,00157	30	86	0,00552	8,6	0,0000409	0,000141	45	78	0,00249	25	0,000292	0,000340
40	—	60	0,000575	0,00146	55	95	—	14,7	0,0000210	0,000138	60	84	0,00240	31	0,000228	0,000328
50	—	65	0,000570	0,00141	70	96	0,00554	17,8	0,0000171	0,000141	75	87	0,00231	36	0,000202	0,000325

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung verschiedener anorganischer Salze (die Chloride von $Li^{\cdot}$, $Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$, $Rb^{\cdot}$, $Cs^{\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$, $Mg^{\cdot\cdot}$, $Ba^{\cdot\cdot}$, $Mn^{\cdot\cdot}$, $Co^{\cdot\cdot}$, $Ni^{\cdot\cdot}$, $Hg^{\cdot\cdot}$, $Cd^{\cdot\cdot}$, $Rh^{\cdot\cdot\cdot}$, $Ce^{\cdot\cdot\cdot}$, $La^{\cdot\cdot\cdot}$, $Al^{\cdot\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Zr^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$, $Ti^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$, die Nitrate von $Ag^{\cdot}$, $Pb^{\cdot\cdot}$, $Sr^{\cdot\cdot}$ und $Bi^{\cdot\cdot\cdot}$, ferner $BeSO_4$, Na_2MoO_4 und $KSbO_2$) auf die Kaninchenblutkatalase in ihrer Beziehung zur Salzkonzentration und bei einigen auch im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierbei ergaben sich im wesentlichen folgende Resultate.

1. Viele Metallsalze reagieren in wässeriger Lösung mehr oder weniger stark *sauer*, einige davon noch in hohen Verdünnungen. Zur Ausschaltung dieser Nebenwirkung wurden die sauren Salzproben durch Rücktitration mit NaOH auf den p_H-Wert der Wasserkontrolle (6,2) gebracht; einige Salze fielen dabei in stärkeren Konzentrationen als Hydroxyde aus und konnten erst unterhalb der Fällungszone untersucht werden.

2. Keines von den geprüften Metallsalzen verhielt sich ganz indifferent gegenüber der Katalase. Die meisten *hemmten* die Katalase. Die schwächste Inaktivierung zeigten die Chloride der Alkalimetalle; innerhalb der übrigen Verbindungen waren starke spezifische Giftwirkungen zu erkennen. Von der geringen Hemmungskraft der monovalenten Chloride der Alkalimetalle abgesehen, war eine strenge Beziehung zwischen Giftigkeit und Valenz nicht zu ersehen. *Stimulierend* wirkten die sauer reagierenden Salze $BeSO_4$, $AlCl_3$, $FeCl_3$ in Versuchen ohne Rücktitration mit NaOH, in denen jede einzelne Salzprobe mit einer auf dieselbe [$H^{\cdot}$] eingestellten Kontrollösung verglichen wurde.

3. Bei graphischer Darstellung der Salzhemmung (Verbindung der Ordinatenpunkte, welche die den einzelnen Salzmengen entsprechenden Umsätze darstellen) ergaben sich Kurven, welche in ihrer Konfiguration an eine *Dissoziationskurve* erinnern.

4. Die Katalyse des Na_2MoO_4 und $FeCl_3$ wurde im zeitlichen Verlauf verfolgt. Bei ersterem entsprach der Gang der Spaltung ungefähr einem parabelförmigen Verlauf (annähernd durch $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$ ausdrückbar), bei letzterem einer monomolekularen Reaktion. Beim Zusammenwirken vom Na_2MoO_4 und Katalase ergab sich kein additives Verhalten im Sinne einer Leistungssummation, sondern eine Erniedrigung der Umsätze infolge Interferenz der Enzymhemmung durch das Salz mit dessen katalytischer Eigenwirkung. Beim $FeCl_3$ war oberhalb 0,1 Millimol das Zusammenspiel mit Katalase wegen seiner stark sauren Reaktion (unter p_H 3,4) nicht verfolgbar; unterhalb dieser Grenze wurde die obenerwähnte Enzymstimulierung gefunden, wobei $FeCl_3$ für sich allein nicht mehr katalytisch wirkte.

5. Die Hemmungen durch $LaCl_3$, $Sr(NO_3)_2$ und $KSbO_2$ wurden im zeitlichen Verlauf untersucht. Trotz starker Erniedrigung des Umsatzes, welcher nach den Versuchen von *Morgulis* und *Rona* und *Damboviceanu* im Sinne einer Verringerung der Fermentmenge die bimolekulare Zeitregel entsprechen sollte, blieb die Reaktion annähernd anderthalbmolekular.

6. Orientierende Versuche mit $HgCl_2$, $LaCl_3$ und $KSbO_2$ über die Selbstregeneration der Metallvergiftung verliefen *negativ.*

Literatur.

1) Handb. d. Biochem. **1**, 1908. — 2) Chem. d. Enzyme **1**, 1920. — 3) Diese Zeitschr. **58**, 320. — 4) Ebendaselbst **93**, 391. — 5) Siehe Ref. i. Zentralbl. f. Phys. u. Pharm. **1**, 1920; **22**, 455. — 6) Diese Zeitschr. **149**, 63. — 7) Ebendaselbst **33**, 32. — 8) Ebendaselbst **93**, 391. — 9) Ebendaselbst **128**, 108. — 10) Siehe Ref. i. Zentralbl. f. Phys. u. Pharm. **10**, 118. — 11) Fermentforsch. **4**, 191, 1921. — 12) Diese Zeitschr. **140**, 63. — 13) Ebendaselbst **21**, 287. — 14) Journ. of biol. chemistry **47**, 341. — 15) Diese Zeitschr. **84**, 173.

Die hier nicht angeführte Literatur findet sich in obigen Arbeiten zitiert.

Milz und Stoffwechsel.

I. Mitteilung:

Über den Einfluß der Milzexstirpation auf die Stickstoff- und Kreatininausscheidung.

Von

Alexander Palladin und **Lydia Palladin.**

(Aus der Forschungsanstalt für Biochemie zu Charkow.)

(Eingegangen am 7. Juni 1925.)

Der Einfluß der Milz auf die Stoffwechselprozesse ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Die Resultate der zur Klärung dieser Frage angestellten Untersuchungen, die bei weitem nicht vollständig sind und die Frage nicht von allen Seiten beleuchten, sind in vielen Fällen widersprechend. Eins geht mit Sicherheit aus diesen Untersuchungen hervor, nämlich das, daß die Milz neben ihrer bestimmten Rolle im Eisenstoffwechsel auch auf die anderen Stoffwechselprozesse im tierischen Organismus einwirken muß.

Richet[1]) war der erste, der sich die Aufgabe gestellt hatte, die Rolle der Milz im Stoffwechsel aufzuklären. Er studierte den Einfluß der Milzexstirpation bei Hunden auf die Gewichtskurve und Nahrungsaufnahme derselben und kam zu dem Schluß, daß die Milz zweifellos einen Einfluß auf den Stoffwechsel bei Hunden hat, deren Gewicht nach der Splenektomie fällt.

Dagegen konnte *Verzar*[2]), der den Einfluß der Splenektomie auf den Gasaustausch an kurarisierten Hunden studierte, irgendwelchen Einfluß nicht konstatieren. Zu demselben Schluß, daß nämlich die Milz auf den Gaswechsel bei Hunden gar keinen Einfluß habe, kamen *Chu Koda*[3]) und *Doubler*[4]) im Laboratorium von *Asher* (an nicht kurarisierten Hunden). Das entgegengesetzte Resultat erzielten (gleichfalls im Laboratorium von *Asher*) *Danoff*[5]) und *Hauri*[6]) in ihren Versuchen mit Kaninchen und Ratten.

---

[1]) *Richet*, Journ. de physiol. et pathol. gen. **14**, 689, 1912; **15**, 573, 1913.
[2]) *Verzar*, diese Zeitschr. **53**, 69, 1913.
[3]) *Chu Koda*, ebendaselbst **122**, 154, 1921.
[4]) *Doubler*, ebendaselbst **122**, 161, 1921.
[5]) *Danoff*, ebendaselbst **93**, 49, 1918.
[6]) *Hauri*, ebendaselbst **98**, 1, 1919.

Sie fanden, daß die Entfernung der Milz den Gaswechsel sowohl bei Kaninchen (*Hauri*) als auch bei Ratten (*Danoff*) erhöht. Mithin stellen *Asher* und seine Mitarbeiter fest, daß die verschiedenen Tiere sich nicht gleichartig der Milzentfernung gegenüber verhalten: während die Splenektomie bei Kaninchen und Ratten einen verstärkten Gasaustausch hervorruft, übt sie bei Hunden gar keinen Einfluß aus (womit die Resultate von *Richet* nicht übereinstimmen). Dabei ist zu bemerken, daß in den Versuchen von *Danoff* und *Streuli*[1]) die Ratten höchstens 10 Tage lang nach der Operation lebten, dann aber stets eingingen, während dieselben bei den anderen Untersuchern (Amerikanern und Japanern) selbst nach einer viel längeren Zeit nach der Splenektomie noch am Leben waren. So z. B. rief nach den Angaben von *Smith* und *Leach*[2]) die Operation bei den Ratten keine Abweichungen von der Norm hervor, weder im Sinne des Wachstums, noch im Sinne einer Steigerung des Appetits; *Nishikawa* und *Tagaki*[3]) beobachteten die Ratten im Laufe von 15 bis 20 und noch mehr Wochen nach der Operation. Ferner fand *Richet*[4]) bei seinen weiteren Studien über die Rolle der Milz bei Hunden, daß die milzlosen Hunde großer Nahrungsmengen bedürfen, um ihr Gewicht zu bewahren, und daß sie den Hunger schlechter ertragen als normale Tiere, indem sie stärker an Gewicht verlieren und schneller eingehen. Um zur Norm zurückzukehren, bedürfen sie der Zufuhr von größeren Nahrungsmengen als normale Hunde, woraus *Richet* den Schluß zieht, daß die Milz das Bedürfnis nach Nahrung herabsetzt. Ferner fand *Richet*, daß die milzlosen Hunde den Vitaminhunger schlechter ertragen, und glaubt, daß der Milz eine besonders wichtige Rolle im Kohlehydratstoffwechsel zukommt.

Ebensowenig Angaben gibt es betreffs des Einflusses der Milz auf den Stickstoffumsatz. *Bernet*[5]), der im Laboratorium von *Asher* den Einfluß der Splenektomie auf die Stickstoff- und Ammoniakausscheidung bei drei Kaninchen studierte, fand, daß nach der Exstirpation der Milz die Gesamtstickstoffausscheidung im Harn sich erhöhte, während die Ammoniakausscheidung bei einem Kaninchen herabgesetzt, bei einem anderen erhöht und beim dritten unverändert war. Nach seiner Ansicht wirkt die Milz auf den Eiweißumsatz hemmend ein. Beim Vorhandensein derselben ist der Eiweißzerfall herabgesetzt, nach Entfernung derselben erhöht, was auch in einer verstärkten Stickstoffausscheidung im Harn zum Ausdruck kommt.

Richet ist der Meinung, daß die Entfernung der Milz bei Hunden eine Steigerung des Stickstoffwechsels zur Folge hat. *Marino*[6]) studierte den Einfluß der Splenektomie auf den Blutgehalt der Hunde an stickstoffhaltigen Substanzen und fand, daß der Harnstoff zunächst erhöht ist, nach 1 bis 2 Monaten aber zur Norm zurückkehrt; der Gehalt an Aminosäuren und Ammoniak ist zunächst gleichfalls erhöht, wird aber dann normal. Andererseits bleibt der Gehalt des Gesamtstickstoffs und des Trockenrückstandes die ganze Zeit herabgesetzt, während der Gehalt des Reststickstoffs die ganze Zeit erhöht ist.

---

[1]) Welcher fand, daß die splenektomierten Tiere gegen Sauerstoffmangel empfindlicher sind (diese Zeitschr. **87**, 359. 1918.)

[2]) *Smith* and *Leach*, Amer. Journ. of Physiol. **60**, 250, 1922.

[3]) *Nishikawa* und *Tagaki*, Deutsch. med. Wochenschr. **48**, 1067, 1922.

[4]) *Richet*, C. r. Acad. Sc. **176**, 1026, 1923; **177**, 441, 1923.

[5]) *Bernet*, diese Zeitschr. **128**, 251, 1922.

[6]) *Marino*, Atti Accad. dei Lincei **31**, 196, 1922.

Widersprechend sind auch die klinischen Daten. So ist z. B. nach den Angaben von *Tomkins*, *Britingam* und *Drinker*[1]) bei der Splenomegalie der Stickstoffwechsel gesteigert, während er nach der Milzexstirpation um 15 Proz. herabgesetzt ist.

Umber[2]) fand, daß bei der *Banti*schen Krankheit der Eiweißstoffwechsel erhöht ist und daß die Kranken eine negative Stickstoffbalance bei derjenigen Eiweißmenge in der Nahrung aufweisen, bei welcher gesunde im Stickstoffgleichgewichtszustande sich befinden. Nach der Milzentfernung bei diesen Kranken wird die Stickstoffbalance wiederum normal. Diese Daten, die allerdings mit denjenigen von *Lichtwitz*, *Schweriner*[3]) u. a. nicht übereinstimmen, widersprechen den Resultaten der oben erwähnten Untersuchungen von *Asher*, *Bernet* und *Richet*. *Lepehne*[4]) sagt, indem er aus unseren Kenntnissen über die physiologische Rolle der Milz das Fazit zieht, daß nach der Exstirpation derselben die Eisenausscheidung sich verstärkt [siehe z. B. *Zimmermann*[5])], eine Cholesterinämie auftritt und die Stickstoffausscheidung zunimmt.

Wie aus dieser kurzen Literaturübersicht zu ersehen ist, sind unsere Kenntnisse von der Rolle der Milz im Stoffwechsel noch sehr unvollständig. Daher stellten wir Untersuchungen an, die den Zweck hatten, den Einfluß der Milz auf die verschiedenen Phasen des Stoffwechsels, in erster Reihe auf den Stickstoffwechsel, aufzuklären. In dieser Mitteilung werden die Ergebnisse der Versuche mitgeteilt, die über den Einfluß der Splenektomie auf die Ausscheidung des Gesamtstickstoffs und des Kreatinins bei Kaninchen angestellt wurden.

Die Stickstoffausscheidung bei Kaninchen nach der Milzentfernung wurde, wie oben erwähnt, von *Bernet* studiert; er stellte jedoch seine Versuche nur mit drei Kaninchen an und studierte die Stickstoffausscheidung nur im Laufe von höchstens 10 Tagen nach der Operation; dazu kommt, daß jedes der drei Kaninchen bezüglich der Ammoniakausscheidung ein anderes Bild darbot.

Als unsere Versuche bereits abgeschlossen waren[6]), erschien eine Arbeit von *Takahashi*[7]) aus dem *Asher*schen Laboratorium, die die Frage des Einflusses der Splenektomie auf die Stickstoffausscheidung bei Ratten behandelt. Er stellte fünf Versuche mit Ratten an; vor der Operation wurden sieben bis zehn Bestimmungen, nach der Operation zwei bis vierzehn ausgeführt. In drei Versuchen (in einem waren zwei, im anderen drei und im dritten drei Bestimmungen nach der Operation gemacht worden) wurde nach der Splenektomie eine Zunahme der Stickstoffausscheidung. in zwei Versuchen (sechs bis zehn Bestimmungen nach der Operation) eine Abnahme derselben konstatiert.

---

[1]) *Tomkins*, *Brittingam* and *Drinker*, Arch. f. intern. Med. **23**, 441, 1919.

[2]) *Umber*, Münch. med. Wochenschr. Nr. 27, 1912.

[3]) *Schweriner*, Berl. klin. Wochenschr. 1920, S. 1119.

[4]) *Lepehne*, Deutsch. med. Wochenschr. **48**, 1606, 1922.

[5]) *Zimmermann*, diese Zeitschr. **17**, 297, 1902.

[6]) Eine vorläufige Mitteilung über die hier geschilderten Versuche wurde in der *Charkower* Zeitschrift „*Wratschebnoje Djelo*“ Mai 1924 abgedruckt.

[7]) *Takahashi*, diese Zeitschr. **145**, 130, 1924.

Als Versuchstiere dienten uns erwachsene Kaninchen. Im Laufe der ganzen Voroperationsperiode sowie während der ganzen Zeit nach der Operation befanden sie sich in speziellen Käfigen, die für Stoffwechselversuche dienen. Der Harn wurde in 48stündigen Mengen gesammelt und in demselben der Gehalt des *Gesamtstickstoffs* nach der kolorimetrischen Mikromethode *Folin—Farmer—Gulick* und der *Kreatinin*gehalt nach der Methode von *Folin* und *Morris* bestimmt. Als Nahrung diente die ganze Zeit Hafer und Rüben. Dabei wurde eine größere Menge Hafer in den Futtertrog gebracht, damit die Kaninchen, falls sie infolge der Operation einen stärkeren Appetit bekommen sollten, denselben durch ein Mehressen stillen könnten.

Nachdem beim Kaninchen der normale Gehalt an Gesamtstickstoff und an Kreatininstickstoff im 48stündigen Harn festgestellt worden war, wurde es der Operation der Milzentfernung unterzogen.

Die Operation wurde unter Beobachtung strengster Aseptis und Antiseptis auf folgende Weise ausgeführt: Der Schnitt durch die Haut und sämtliche darunterliegenden Gewebe wurde 1½ cm nach links von der Mittellinie (am äußeren Rande des linken M. rectus abdominis), von der linken Unterrippengegend nach unten hin geführt (Länge des Schnittes 5 cm); die Bauchhöhle wurde eröffnet, die Darmschlingen nach seitwärts gedrängt und mit Hilfe von großen sterilen Gazekompressen festgehalten, der Magen erhoben und die Milz erfaßt. Jedes Milzgefäß wurde einzeln unterbunden, worauf die Milz exstirpiert wurde. Schluß der Bauchwunde mittels Schichtnähte und Bestreichung der Stelle des Hautschnittes mit Jod.

Die Operation verlief gewöhnlich ohne Blutverlust. Täglich wurde die Narbe mit Jod bestrichen; bei allen Kaninchen trat stets nach 5 Tagen Heilung per primam ein. Gewöhnlich fraßen die Kaninchen am Tage nach der Operation nichts, während sie am folgenden Tage normalen Appetit und normales Aussehen zeigten.

Sämtliche operierten Kaninchen boten uns nun ein ganz anderes Bild der Gesamtstickstoffausscheidung als es von *Bernet* beschrieben wurde. Die Splenektomie war in unseren Versuchen von *keiner erhöhten Stickstoffausscheidung begleitet.* Im Laufe der ersten 7 bis 10 Tage nach der Operation *blieb die Stickstoffausscheidung im allgemeinen auf derselben Höhe,* auf welcher sie vor der Operation war, während sie später nicht nur nicht eine Zunahme, sondern sogar eine *leichte Abnahme erfuhr.*

Mitunter enthielt nur der am dritten und vierten Tage nach der Operation gesammelte Harn mehr Stickstoff als gewöhnlich, das war jedoch dann der Fall, wenn das Kaninchen am ersten und zweiten Tage nach der Operation fast keinen Harn ließ und demnach der Stickstoff des nach dem vierten Tage gesammelten Harns auch auf Konto dieser beiden ersten Nachoperationstage zu setzen ist.

Tabelle I.

Datum 1924	Körpergewicht g	2 tägige Harnmenge ccm	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Gesamt-N g	Ges.-N pro 1 kg Körpergewicht g	Kreatinin-N g	Kreatinin-N des Ges.-N Proz.	Kreatininkoeffizient	Bemerkungen
26. II.	2145	200	2,717	1,266	0,089	3,27	20,0	Vor der Operation
28. II.	2150	180	2,758	1,280	0,089	3,22	20,6	
1. III.	2155	180	2,717	1,254	0,091	3,31	20,8	
3. III.	2210	180	2,688	1,215	0,091	3,38	19,8	
5. III.	2223	170	2,626	1,136	0,082	3,12	18,9	
7. III.	2200	125	2,551	1,158	0,082	3,21	18,6	
9. III.	2190	75	2,083	0,951	0,069	3,31	15,7	
11. III.	2215	70	1,724	0,777	0,068	3,94	15,3	Am 11. III. Operation
Durchschnittlich	—	—	**2,484**	**1,127**	**0,082**	**3,34**	**18,6**	
13. III.	1990	—	—	—	—	—	—	Nach der Operation
15. III.	1960	175	4,545	2,315	0,158	3,47	—	
17. III.	2165	95	2,280	1,052	0,076	3,32	17,5	
19. III.	2165	65	2,173	1,003	0,073	3,36	16,8	
21. III.	2050	135	2,535	1,203	0,100	3,98	24,2	
Durchschnittlich	—	—	**2,306**	**1,044**	0,081	**3,53**	19,5	
23. III.	2230	90	2,000	0,896	0,093	4,65	21,8	
25. III.	2130	170	1,923	0,902	0,093	4,83	21,8	
27. III.	2130	155	1,984	0,931	0,111	5,59	26,1	
29. III.	2085	120	1,237	0,593	0,069	5,57	16,5	
31. III.	2100	165	1,923	0,915	0,121	6,92	28,8	
Durchschnittlich	—	—	**1,813**	**0,847**	**0,097**	**5,51**	**23,5**	
6. IV.	2120	110	1,488	0,701	0,093	6,25	21,5	
8. IV.	2080	150	1,524	0,732	0,139	9,12	33,4	
10. IV.	2095	125	1,318	0,628	0,107	8,11	25,5	
12. IV.	2110	135	1,524	0,710	0,111	7,28	28,6	
14. IV.	2105	165	1,562	0,722	0,123	7,87	29,2	
Durchschnittlich	—	—	**1,483**	**0,698**	**0,114**	**7,72**	**27,6**	
18. V.	2105	200	1,524	0,723	0,107	7,02	25,4	
20. V.	2110	215	1,470	0,696	0,118	8,03	27,9	
22. V.	2110	190	1,470	0,696	0,111	7,55	26,3	
Durchschnittlich	—	—	**1,488**	**0,705**	**0,112**	**7,53**	**26,5**	

In den Tabellen I, II und III sind als Beispiel die Protokolle dreier unserer Versuche mit Milzentfernung[1]) angeführt. Wie aus dem ersten Protokoll zu ersehen ist, enthielt der vor der Operation im Laufe von 48 Stunden gelassene Kaninchenharn im Durchschnitt 2,484 g Gesamt-

[1]) Im ganzen wurden zehn Versuche angestellt.

Tabelle II.

Datum	Körpergewicht	2 tägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an				Kreatininkoeffizient	Bemerkungen
			Gesamt-N	Ges.-N pro 1 kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatinin-N des Ges.-N		
1924	g	ccm	g	g	g	Proz.		
26. II.	2615	295	2,777	1,062	0,087	3,13	16,5	Vor der Operation
28. II.	2715	250	2,777	1,053	0,087	3,13	17,8	
1. III.	2800	200	2,873	1,026	0,087	3,02	15,5	Am 3. III. Operation
3. III.	2930	285	2,873	0,990	0,087	3,02	14,8	
Durchschnittlich	—	—	**2,825**	**1,037**	**0,087**	**3,07**	**16,1**	
5. III.	2715	165	2,436	0,891	0,091	3,73	18,6	Nach der Operation
7. III.	2780	205	2,314	0,831	0,084	3,63	15,1	
Durchschnittlich	—	—	**2,375**	**0,861**	**0,087**	**3,68**	**16,8**	
21. III.	2475	215	2,777	1,121	0,082	2,95	16,6	
23. III.	2515	140	1,953	0,777	0,082	4,19	15,8	
25. III.	2500	185	1,984	0,763	0,093	4,67	18,6	
27. III.	2545	190	2,000	0,785	0,101	5,05	19,8	
29. III.	2575	235	1,893	0,735	0,093	4,70	18,5	
Durchschnittlich	—	—	**2,121**	**0,836**	**0,090**	**4,31**	**17,8**	
6. IV.	2600	250	1,851	0,711	0,101	5,45	19,9	
8. IV.	2615	220	1,851	0,705	0,132	7,13	25,4	
10. IV.	2595	—	—	—	—	—	—	
12. IV.	2680	215	2,136	0,790	0,123	5,75	22,9	
14. IV.	2670	285	2,192	0,805	0,123	5,61	23,0	
Durchschnittlich	—	—	**2,007**	**0,752**	**0,119**	**5,98**	**22,8**	
18. V.	2720	230	2,083	0,765	0,123	5,90	22,7	
20. V.	2725	190	1,724	0,632	0,111	6,43	20,4	
22. V.	2690	160	1,428	0,530	0,111	7,70	21,2	
Durchschnittlich	—	—	**1,745**	**0,642**	**0,115**	**6,67**	**21,4**	

stickstoff. In den ersten 10 Tagen nach der Splenektomie wurden im Laufe von 48 Stunden durchschnittlich 2,305 g Gesamtstickstoff ausgeschieden, in der Periode vom 11. bis zum 20. Tage nach der Operation 1,813 g Stickstoff; vom 25. bis zum 34. Tage 1,483 g Gesamtstickstoff und vom 67. bis zum 72. Tage nach der Operation 1,488 g Gesamtstickstoff. Wir sehen also, daß die Gesamtstickstoffausscheidung nach der Milzentfernung allmählich abnahm, am 25. Tage nach der Operation nur 0,742 g pro 24 Stunden betrug und auf diesem Niveau während der ganzen weiteren Periode stehen blieb, denn ebensoviel Stickstoff wurde auch am 34. und 72. Tage nach der Operation ausgeschieden.

Tabelle III.

Datum 1924	Körpergewicht g	2 tägige Harnmenge ccm	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an: Gesamt-N g	Ges.-N pro 1 kg Körpergewicht g	Kreatinin-N g	Kreatinin-N des Ges.-N Proz.	Kreatininkoeffizient	Bemerkungen
20. IV.	1885	360	1,785	0,94	0,093	5,5	25	Vor der Operation
22. IV.	1935	315	1,515	0,79	0,093	6,0	24	
24. IV.	1960	290	1,612	0,82	0,101	6,2	25	Am 24. IV. Operation
Durchschnittlich	—	—	**1,687**	**0,85**	**0,095**	**5,9**	**24,6**	
26. IV.	1810	195	2,272	1,21	0,093	4,3	25	Nach der Operation
28. IV.	1805	310	1,515	0,83	0,101	6,2	26	
30. IV.	1850	250	1,428	0,77	0,093	6,1	25	
2. V.	1865	285	1,470	0,76	0,101	6,5	26	
4. V.	1915	220	1,315	0,68	0,082	6,3	21	
Durchschnittlich	—	—	**1,600**	**0,85**	**0,094**	**5,8**	**24,6**	
6. V.	1890	300	1,785	0,94	0,101	5,7	26	
8. V.	1935	245	1,470	0,75	0,074	5,0	19	
10. V.	1990	190	1,612	0,80	0,088	5,5	23	
12. V.	2040	255	1,723	0,69	0,088	5,2	22	
14. V.	1940	270	1,923	0,98	0,102	5,4	25	
Durchschnittlich	—	—	**1,700**	**0,85**	**0,090**	**5,3**	**23**	
12. VII.	2105	205	1,351	0,64	0,101	7,4	24	
14. VII.	2145	290	1,336	0,62	0,101	7,6	24	
16. VII.	2155	300	1,250	0,59	0,105	8,4	25	
18. VII.	2190	300	1,268	0,58	0,111	8,8	26	
20. VII.	2220	325	1,351	0,61	0,150	11,1	34	
Durchschnittlich	—	—	**1,311**	**0,60**	**0,113**	**8,6**	**26,6**	

Welchen Einfluß hatte nun die Splenektomie auf die Menge der von den Kaninchen aufgenommenen Nahrung, mit anderen Worten auf ihren Appetit? An Rüben bekamen die Kaninchen je 200 g pro 48 Stunden, welche Menge sie vollständig auffraßen. Was nun die von ihnen aufgefressene Hafermenge anbelangt, so war sie eine verschiedene, im allgemeinen könnte man jedoch den Schluß ziehen, daß die Kaninchen in der ersten Zeit nach der Operation (vom 6. bis zum 14. Tage) etwas mehr Hafer als gewöhnlich auffraßen, dann aber wurde ihr Appetit wieder normal, und in der nachfolgenden Periode war die Nahrungsaufnahme nicht nur nicht erhöht, wie man nach den Versuchen von *Richet* an Hunden hätte erwarten können, sondern sogar leicht vermindert (womit vielleicht die herabgesetzte Stickstoffausscheidung zum Teil in Verbindung zu bringen ist).

Dasselbe Bild der Beeinflussung der Gesamtstickstoffausscheidung durch die Splenektomie bietet auch das zweite Protokoll (Tabelle II). In der Norm wurden im Laufe von 48 Stunden 2,825 g Gesamtstickstoff ausgeschieden; in den ersten 4 Tagen nach der Operation wurden 2,375 g Gesamtstickstoff, in der Zeit vom 17. bis zum 28. Tage nach der Operation während 48 Stunden 2,101 g Stickstoff ausgeschieden; vom 33. bis zum 42. Tage 2,007 g; vom 75. bis zum 80. Tage 1,745 g Gesamtstickstoff. Dasselbe Resultat gaben auch alle übrigen Versuche.

Somit *erfährt zunächst die Gesamtstickstoffausscheidung bei Kaninchen nach der Splenektomie fast keine Veränderung, dann aber beginnt sie abzunehmen, um auf einem niedrigeren Niveau*[1]) als in der Norm *stehenzubleiben*. Das gleiche Bild erhalten wir, wenn wir die absolute Stickstoffmenge *auf Kilogramm Körpergewicht umrechnen* (siehe Tabelle I und II, fünfte Kolonne).

Wodurch läßt sich nun das ganz andere Resultat erklären, das *Bernet* an seinen drei Kaninchen erzielte? Offenbar dadurch, daß er die Stickstoffausscheidung nur im Laufe der ersten 6 bis 10 Tage nach der Operation untersuchte. Auch in unserem Versuche, dessen Protokoll in Tabelle IV angeführt ist und der 10 Tage nach der Operation unterbrochen wurde, können wir noch keine Abnahme der Gesamtstickstoffausscheidung[2]) feststellen.

Tabelle IV.

Datum	Körpergewicht	2 tägige Harnmenge	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an				Kreatininkoeffizient	Bemerkungen
			Gesamt-N	Ges.-N pro 1 kg Körpergewicht	Kreatinin-N	Kreatinin-N des Ges.-N		
1924	g	ccm	g	g	g	Proz.		
16. IV.	2040	210	2,500	1,22	0,079	6,3	19	Vor der Operation
18. IV.	2145	110	2,083	0,97	0,079	7,9	18	
20. IV.	2155	105	1,428	0,66	0,062	8,7	15	
22. IV.	2175	110	1,470	0,68	0,061	8,6	14	Am 24. IV Operation
24. IV.	2190	115	2,083	0,95	0,066	6,6	15	
Durchschnittlich	—	—	**1,918**	**0,89**	**0,069**	**7,6**	**16**	
26. IV.	2060	145	2,192	1,06	0,055	5,3	13	Nach der Operation
28. IV.	2070	160	1,851	0,90	0,061	6,8	15	
30. IV.	2100	130	1,724	0,82	0,056	6,5	14	
2. V.	2075	155	1,923	0,92	0,062	6,5	15	
4. V.	2090	90	1,723	0,82	0,055	6,5	13	
Durchschnittlich	—	—	**1,882**	**0,90**	**0,058**	**6,3**	**14**	

[1]) In Übereinstimmung hiermit finden sich die oben erwähnten klinischen Angaben, z. B. von *Umber*.

[2]) Sowie keine Zunahme der Kreatininausscheidung.

Ein anderes Bild bietet uns das *Kreatinin.* In den ersten Tagen nach der Milzentfernung sind im Harn fast die gleichen Kreatininmengen enthalten, wie auch in der Norm (beim Vorhandensein der Milz); dann nimmt die Kreatininausscheidung zu und *bleibt in der Folgezeit erhöht.* Mithin *scheiden Tiere, denen die Milz entfernt worden ist, mehr Kreatinin aus, als normale.* Wenn vor der Operation ein bestimmter Prozentsatz des Gesamtstickstoffs in Form von Kreatinin zur Ausscheidung kam, so ist dieser Prozentsatz bei milzlosen Tieren bedeutend erhöht. Wenn beispielsweise vor der Operation gegen 3 Proz. des Gesamtstickstoffs in Form von Kreatininstickstoff ausgeschieden wurde, so kommen nach einem Monat und mehr nach der Milzexstirpation auf die Kreatininstickstoffkomponente 6 bis 7 Proz. des Gesamtstickstoffs. Ebenso verändert sich auch der *Kreatininkoeffizient.* Die erste Zeit nach der Operation bleibt er fast unverändert, dann erhöht er sich und bleibt in der Folgezeit ein höherer als in der Norm.

So z. B. schied das Kaninchen, dessen Versuchsprotokoll in Tabelle I angeführt ist, vor der Operation im Durchschnitt 0,082 g Kreatininstickstoff während 48 Stunden aus, was 3,34 Proz. des Gesamtstickstoffs ausmacht. Nach der Operation schied es in den ersten 10 Tagen die gleiche Menge aus, und zwar 0,081 g (3,53 Proz. des Gesamtstickstoffs). Dann nahm die Kreatininausscheidung zu und erreichte am 20. bis 25. Tage die mittlere Größe von 0,110 g pro 48 Stunden (6 bis 7 Proz. des Gesamtstickstoffs); auf diesem Niveau stand die Kreatininausscheidung auch am 35. und 72. Tage nach der Operation. Der Kreatininkoeffizient bei diesem Kaninchen stieg von 18,6 auf 26,0 bis 27,0. Das gleiche sehen wir bei dem Kaninchen, für welches die Daten in Tabelle II angeführt sind. Auch hier stieg die Kreatininausscheidung von der fast gleichen Normalzahl 0,087 g Kreatininstickstoff pro 48 Stunden, oder etwa 3 Proz. des Gesamtstickstoffs, am 20. bis 30. Tage nach der Operation auf 0,110 g pro 48 Stunden (5 bis 6 Proz. des Gesamtstickstoffs) und blieb auf dieser Höhe auch am 40. und 80. Tage nach der Operation stehen. Der Kreatininkoeffizient stieg bei ihm von 16,1 auf 21,0 bis 22,0.

Wir sehen also, daß die *Milz auf die Stickstoffwechselprozesse einen Einfluß ausübt,* da die Exstirpation derselben sowohl in der Gesamtstickstoff- als auch in der Kreatininausscheidung Veränderungen hervorruft. Diese Veränderungen treten nicht sogleich nach der Operation auf, sondern allmählich.

Wir wissen, daß nach der Entfernung der Milz die Rolle derselben von anderen Organen übernommen wird. Es genügt z. B., auf die Untersuchungen von *Nishikawa* und *Tagaki* hinzuweisen, nach welchen es nach der Splenektomie in der Leber zu einer Wucherung von milzähnlichem Gewebe aus den *Kupfer*schen Zellen kommt.

Bei den Ratten erreicht die Wucherung dieses vikariierenden Gewebes ihren Höhepunkt nach 10 bis 15 Wochen. Daher können die Veränderungen, die in den Stoffwechselprozessen in den ersten Tagen nach der Milzentfernung auftreten, nicht als endgültig betrachtet werden. Sie werden sich in dem Maße verändern, wie das Fehlen der Milz die anderen Organe, die diese oder jene Rolle im Stoffwechselprozeß spielen, beeinflussen wird, in dem Maße, wie die vikariierenden Organe und Gewebe die Rolle der Milz auf sich nehmen werden.

Unsere Versuche zeigen aber, daß das Fehlen der Milz hinsichtlich ihres Einflusses auf den Eiweißstoffwechsel durch andere Organe nicht vollständig kompensiert werden kann, denn auch nach 10 bis 12 Wochen bleibt der Stickstoff-, besonders der Kreatininstoffwechsel gestört, was sich in vollem Einklang mit den Resultaten von *Marino* befindet. Er fand, daß die nach der Splenektomie auftretenden Veränderungen des Blutgehaltes an stickstoffhaltigen Substanzen mit der Zeit sich wieder ausgleichen, allerdings nicht in vollständiger Weise: erhöht bleibt der Gehalt an *Reststickstoff*, wobei weder der Harnstoff, noch die Aminosäuren, noch das Ammoniak an dieser Erhöhung teilnehmen. Die oben beschriebenen Versuche gestatten die Annahme, daß diese Erhöhung, wenn auch nur teilweise durch das Kreatinin bedingt ist. Die Aufklärung dieser Frage und derjenigen des Einflusses der Splenektomie auf die anderen Stickstoffwechselkomponenten, sowie die Klarstellung des Mechanismus der beschriebenen Erscheinungen, müssen weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, die gegenwärtig in unserem Laboratorium ausgeführt werden.

Zusammenfassung.

1. Die Milzentfernung bei Kaninchen ruft eine Störung des Stickstoffwechsels hervor, was in der Gesamtstickstoff- und Kreatininausscheidung zum Ausdruck kommt.

2. Nach der Splenektomie ist die Gesamtstickstoffausscheidung herabgesetzt.

3. Die Milzentfernung ruft sowohl eine absolute als auch (im Verhältnis zum Gesamtstickstoff) relative Zunahme der Kreatininausscheidung hervor; in Übereinstimmung hiermit ist auch der Kreatininkoeffizient erhöht.

4. Die angegebenen Veränderungen im Stickstoffwechsel treten nicht gleich nach der Splenektomie auf, sondern entwickeln sich allmählich und können nur dann festgestellt werden, wenn die Tiere mindestens 1½ bis 2 Monate nach der Operation im Versuche bleiben.

Über den Einfluß der künstlichen venösen Stauung auf Gewicht, Dichte und Volumen der roten Blutkörperchen.

Von

Lorenzo Pezzotti.

(Aus dem städtischen Spital zu Vicenza.)

(Eingegangen am 9. Juni 1925.)

Bis vor wenigen Jahren war die Ansicht verbreitet, daß der Chemismus der Erythrocyten wenig rege sei, und das schien durch die Tatsache bewiesen, daß die roten Blutkörperchen unter den weichen Geweben den geringsten Gehalt an Wasser aufweisen.

In der Tat geht aus *Bunges* und *Bottazzis* Messungen hervor, daß, während das Nervengewebe 78 Proz., das Muskelgewebe 75 Proz. Wasser enthält, die roten Blutkörperchen nur 63,3 Proz. Wasser enthalten. Damit stimmen die neueren Untersuchungen von *M. Richter*, welcher beinahe denselben Wert, nämlich 66 Proz., fand.

Aber man muß hinzufügen, daß man unter den Aufgaben der Erythrocyten fast nur die des Hämoglobins untersucht hatte, welches, infolge seiner großen Affinität zum Sauerstoff, ohne daß große metabolische Vorgänge nötig wären, unter dem Einfluß des Druckes dieses Gases, sich in Oxyhämoglobin verwandelt und sich dann wieder zurück zu Hämoglobin reduziert.

Dagegen haben die neuesten Kenntnisse über die physikalische Chemie der Kolloide im allgemeinen und über die kolloide Natur des Blutplasmas und die emulsionelle kolloide Natur der Blutkörperchen im besonderen uns zu der Überzeugung gebracht, daß die roten Blutkörperchen nicht allein Sauerstoffträger sind, sondern auch wichtige physikalisch-chemische Veränderungen infolge mannigfacher Ursachen erleiden können.

Obwohl man noch wenig über die Vorgänge und Wirkungen dieser Veränderungen kennt, genügt, ihnen eine große Bedeutung zu verleihen, die nunmehr begründete Annahme, daß nicht allein das Blutplasma, sondern auch die Blutkörperchen aktiv in jene äußerst verwickelten Vorgänge eingreifen, welche in physiologischen und pathologischen Umständen die Beziehungen zwischen Blut und Gewebsflüssigkeiten regeln.

Daher ist die noch unentschiedene Frage über die physikalisch-chemischen Veränderungen der roten Blutkörperchen unter dem Einflusse der Venosität des Blutes und der Stauung von Bedeutung. Ausschlaggebend in dieser Beziehung sind die Untersuchungen von *Hamburger*.

Von den späteren nenne ich nur die von *G. Aiello* (1), weil sie in engerer Beziehung zu meinen Untersuchungen stehen. Dieser Autor faßt die bisherigen Kenntnisse über den Einfluß der venösen Stauung auf die physikalisch-chemische Beschaffenheit der roten Blutkörperchen zusammen und stellt seine eigenen im Laboratorium des Prof. *W. Falta* durchgeführten Untersuchungen dar. Für Einzelheiten verweise ich auf die Originalarbeit.

Hier erinnere ich nur, daß *Aiello* das venöse Blut ohne Stauung und nach einer kurzen Stauung untersuchte. Die Stauung wurde 4 Minuten lang durch mäßiges Anziehen eines Gummigurtes erreicht: Bei diesen Untersuchungen fand er unter anderem, daß durch die Stauung das Volumen der roten Blutkörperchen etwas zunimmt, der Wassergehalt des Serums gewöhnlich leicht abnimmt oder unverändert bleibt, während der Wassergehalt der roten Blutkörperchen in den meisten Fällen beträchtlich abnimmt.

Aiello hat den Wassergehalt des Blutes (Gesamtblut, Serum und Blutkörperchen) aus der Gewichtsdifferenz des Trockenrückstandes berechnet und hat das Volumen der Erythrocyten nachher durch die von *Hamburger* und *Ege* verbesserte Methode des Hämatokriten bestimmt. Bei dieser Gelegenheit bemerke ich, daß die Zunahme des prozentischen (hämatokritischen) Volumens der roten Blutkörperchen nach Stauung für sich allein nicht eine Volumenzunahme der einzelnen Erythrocyten bedeutet, da ja durch die Stauung die Zahl der Erythrocyten pro Volumeneinheit Blut zunimmt.

Einen genauen Wert kann man nur aus dem Vergleich zwischen Volumen und Zahl der roten Blutkörperchen erhalten, worüber ich bei *Aiello* keine Angabe finde.

Auch auf Grund dieser Betrachtungen habe ich einen Beitrag zur Klärung dieser Fragen bringen wollen, indem ich eine Methode anwandte, die mit genügender Genauigkeit Volumen, Gewicht und Dichte jedes einzelnen Erythrocyten zu bestimmen erlaubt. Es sei hier ein für allemal bemerkt, daß, wenn ich von Volumen, Gewicht und Dichte eines einzelnen roten Blutkörperchens spreche, ich mich natürlich auf Mittelwerte beziehe.

Ich arbeitete nach der von *E. Meneghetti* (2) 1922 vorgeschlagenen Methode, wozu nur folgende drei einfachen Instrumente nötig sind:

Ein Hämatokrit, ein Pyknometer und ein Blutkörperchenzähler. Mit dem Hämatokriten bestimmt man das relative Volumen der im Blut enthaltenen Erythrocyten; mit dem Pyknometer bestimmt man das Gewicht eines bestimmten Volumens des (defibrinierten) Blutes und des gleichen Volumens Serum; mit dem Blutkörperchenzähler bestimmt man die Zahl der Blutkörperchen pro Kubikmillimeter desselben Blutes; dann kann man mit einer einfachen Rechnung die Zahl der im betreffenden pyknometrischen Volumen enthaltenen Blutkörperchen berechnen.

Aus diesen Werten erhält man *Gewicht* und *Dichte* eines einzelnen roten Blutkörperchens aus folgenden zwei Formeln:

$$p = \frac{V(P - P') + vP'}{nV} \tag{1}$$

$$d = \frac{V(P - P') + vP'}{vV} \tag{2}$$

wobei

p = gesuchtes Gewicht,
d = gesuchte Dichte,
V = untersuchtes Volumen (d. h. Volumen des Pyknometers),
P = Gewicht des defibrinierten Blutvolumens V,
P' = Gewicht des Serumvolumens V,
n = Zahl der im Volumen V enthaltenen roten Blutkörperchen,
v = Volumen (im Hämatokriten gemessen) der im Volumen V enthaltenen roten Blutkörperchen.

Diese sind die von *Meneghetti* vorgeschlagenen Originalformeln. Ich habe aber gefunden, daß sie vereinfacht werden können (3). Wenn man mit e den hämatokritischen Wert bezeichnet (d. h. das von der Skala des Hämatokriten angegebene prozentische Volumen der roten Blutkörperchen), so ergibt sich offenbar

$$v = \frac{eV}{100}.$$

Wenn man nun diesen Ausdruck für v der Formel (1) einsetzt, so erhält man

$$p = \frac{V(P - P') + \frac{eV}{100}}{nV}$$

und abkürzend

$$p = \frac{P - P' + \frac{P'e}{100}}{n}$$

Ebenso wird man die Formel (2) durch folgende ersetzen können

$$d = \frac{P - P' + \frac{P'e}{100}}{\frac{Ve}{100}}.$$

Das *Volumen* der einzelnen Erythrocyten kann man nach folgenden Methoden berechnen:

1. Durch Division des prozentischen (hämatokritischen) Volumens durch die Zahl der in einem Kubikmillimeter enthaltenen roten Blutkörperchen.

Es ist offensichtlich, daß, da der vom Hämatokriten angegebene Wert ein prozentischer ist, er auf jede beliebige Volumeneinheit bezogen werden kann, also auch auf 1 cmm, worauf sich die Zählung der roten Blutkörperchen bezieht.

Man erhält so das absolute Volumen eines Erythrocyten, ausgedrückt in Bruchteilen eines Kubikmillimeters.

2. Durch Division der Zahl der im Kubikmillimeter enthaltenen roten Blutkörperchen durch das prozentische Volumen.

Man erhält so das, was ich *globulimetrischer Index oder Quotient des Hämatokriten* zu nennen vorgeschlagen habe, welcher eben der Zahl der pro Skalenstrich des Hämatokriten enthaltenen roten Blutkörperchen entspricht. Es ist klar, daß je kleiner das Volumen der Erythrocyten ist, um so größer der globulimetrische Quotient ist, und umgekehrt.

3. Durch Berechnung des *volumetrischen Index* des Erythrocyten oder *volumetrischen Quotienten*, wie ihn *Sahli*, entsprechend dem hämoglobinischen Quotienten, benennt. Man erhält ihn durch Division des prozentischen Volumens der Erythrocyten durch ihre Zahl pro Kubikmillimeter. Man macht also die umgekehrte Division als früher, mit dem Unterschied, daß Volumen und Zahl in Prozenten der Norm ausgedrückt werden oder mit zwei Brüchen. Im ersten Bruch bedeutet der Zähler das hämatokritische Volumen des untersuchten Blutes, und der Nenner das als normal angesehene hämatokritische Volumen.

Im zweiten Bruch bedeutet der Zähler die gefundene Erythrocytenzahl pro Kubikmillimeter des untersuchten Blutes, und der Nenner die als normal angesehene Erythrocytenzahl, d. h. für Männer 5000000, für Frauen 4500000.

Der volumetrische Quotient entspricht, wie oben bemerkt, dem hämoglobinischen Quotienten und ist wie dieser in normalen Fällen gleich 1.

Er ist um so größer als 1, je größer das Volumen der roten Blutkörperchen ist, und umgekehrt.

In einer früheren Arbeit über die klinischen Anwendungsgebiete des Hämatokriten (4) habe ich bewiesen, daß die Werte des volumetrischen Quotienten nicht immer genau sind, da dieser Quotient das Verhältnis zweier Brüche darstellt, in denen die Zähler sich verändern können, ohne daß die Änderungen proportional sein müssen, da ja die Nenner unveränderlich und theoretisch „a priori" bestimmt sind. Deshalb habe ich in den Versuchen, die den Stoff dieser Arbeit bilden, das Volumen der Erythrocyten im absoluten Wert oder mit dem globulimetrischen Quotienten des Hämatokriten ausgedrückt.

Die Untersuchungstechnik war folgende:

Ich habe allein mit menschlichem Blute gearbeitet, und zwar mit venösem Blute von 20 bis 35jährigen Frauen, bei denen man nach dem

klinischen Befund und aus den Blutuntersuchungen annehmen konnte, daß Blut und Kreislauf normal waren.

Das Blut wurde immer nüchtern entnommen, nie während oder kurz vor oder nach den Menses. Ich zog das Blut aus einer Vene der Ellenbeuge ohne Stauung, indem ich den Gurt kurz vor dem Einstich anzog und ihn dann sofort wegnahm und eine Zeitlang wartete, bis ich das Blut in die Spritze einsog. Am nächsten Tage dagegen entnahm ich das Blut nach einer Stauung von ¼ Stunde. Der Gurt war nie so fest angezogen, daß der Radialispuls merklich verändert worden wäre.

Ich habe schon in meinen früheren Arbeiten die technischen Details dargestellt. Ich wiederhole sie aber kurz hier, da es sich um Untersuchungen handelt, die nicht schwer sind, aber ein genaues Arbeiten erfordern, um zuverlässig zu sein. Zur *Defibrinierung* wird das Blut in ein mit geschliffenem Stöpsel versehenes Glasgefäß gebracht, das einen etwas größeren Inhalt hat, als das Volumen des Blutes selbst beträgt. Der Unterschied wird dann durch Glaskugeln ausgeglichen. Das *Serum* erhielt ich durch Zentrifugieren des defibrinierten Blutes oder indem ich Blut in einer Petrischale bei (kühler) Zimmertemperatur gerinnen ließ. Ich fand, daß die eine oder die andere Methode ein gleich brauchbares Serum liefern. Das ganze Material war im Autoklaven keimfrei gemacht worden.

Das defibrinierte Blut wurde nicht filtriert, wie einige Forscher es raten, um kleine Fibrinteilchen zu entfernen, da mir diese Vorsicht praktisch überflüssig erschien.

Die Blutkörperchen wurden nach Defibrinierung und nach Verdünnung von 0,50 auf 100 mit 0,90proz. Kochsalzlösung in der *Bürker*schen Zählkammer gezählt. Für jede Blutprobe zählte ich 25mal eine Gruppe von 16 kleinen Quadraten und wechselte den Tropfen so oft als möglich.

Ich will auch hinzufügen, daß ich jedesmal mit einer kleinen Wasserwage untersuchte, ob das Mikroskoptischchen auch genau wagerecht sei, da ich überzeugt bin, daß mit dieser Vorsicht, die übertrieben erscheinen könnte, nicht geringe Zählfehler vermieden werden können.

Zur Bestimmung des prozentischen Volumens verwandte ich den *Daland*schen Hämatokriten mit auf Hunderstel graduierten Röhrchen.

Ich prüfte die Skala dieser Röhrchen nach, indem ich dasselbe Blut in verschiedenen Röhrchen zentrifugierte und jene ausschied, welche Unterschiede von $\pm$ 2 Strichen oder mehr aufwiesen im Vergleich mit dem einstimmig von drei bis vier anderen Röhrchen gezeigten Werten.

Wenn man eine gute elektrische Zentrifuge besitzt, so ist es nicht notwendig, so lange zu zentrifugieren, wie einige Forscher vorschreiben.

Durchschnittlich ½ Stunde ist genügend. Die Wägungen wurden sofort nach Defibrinierung bzw. nach Bildung des Serum vorgenommen. Die Wage war auf $^1/_{10}$ mg empfindlich. Die Temperatur des Serums und des Blutes war immer genau 15° C.

Die *Ergebnisse* sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle I entspricht den auf das Blut ohne Stauung ausgeführten Bestimmungen.

Tabelle II nach Stauung.

Die Gewichte P und P' sind in Grammen ausgedrückt.

Das Gewicht p ist in 10 bis 12 g ausgedrückt (Gramm zur zwölften negativen Potenz).

Vol = durchschnittliches Volumen eines Erythrocyten, ausgedrückt in 10 bis 10 cmm (Kubikmillimeter zur zehnten negativen Potenz).

Q. glob. = globulimetrischer Quotient des Hämatokriten (s. oben).

e, *n* und *d* haben die gleiche Bedeutung wie in den oben genannten Formeln.

Das von mir in allen Versuchen gebrauchte Pyknometer faßte 1,606 cmm. Daher entspricht das *V* der oben genannten Formeln eben 1,606.

Tabelle I.

Versuchszahl	*P*	*P'*	*e*	*n*	*p*	*d*	Vol	Q. glob.
1	1,7003	1,6542	47	4 750 000	107,96	1,091	989	101,063
2	1,6971	1,6655	50	4 744 000	113,44	1,076	1053	94,880
3	1,6933	1,650	40	4 625 000	94,68	1,094	864	115,625
4	1,6898	1,6405	38	4 350 000	96,28	1,102	873	114,473
5	1,7112	1,6551	47	5 150 000	100,83	1,104	912	109,574
6	1,6903	1,6425	39	4 572 750	93,75	1,099	852	117,250
7	1,6952	1,6488	42	4 307 000	106,82	1,095	975	102,550
8	1,6991	1,6491	44	4 390 000	110,00	1,097	1002	99,772
9	1,7002	1,6480	46	4 735 000	106,81	1,099	971	102,934
10	1,6995	1,6542	45,5	5 000 000	99,37	1,092	910	109,890

Tabelle II.

Versuchszahl	*P*	*P'*	*e*	*n*	*p*	*d*	Vol	Q. glob.
1	1,7033	1,6545	50	5 105 000	108,07	1,103	979	102,100
2	1,6994	1,6051	53,9	5 121 500	113,28	1,090	1052	95,018
3	1,6949	1,6515	46	5 101 000	98,03	1,088	901	110,891
4	1,6939	1,6421	44,5	4 810 000	101,30	1,094	925	108,089
5	1,7130	1,6557	48	5 230 000	101,44	1,105	917	109,166
6	1,7128	1,6491	48,5	5 315 000	101,04	1,108	912	109,587
7	1,7010	1,6495	45	4 657 200	106,10	1,098	966	103,493
8	1,7022	1,6505	48	4 650 000	113,00	1,094	1032	96,875
9	1,7073	1,6492	54	5 215 000	113,26	1,093	1035	96,574
10	1,7043	1,6572	48	5 285 000	99,26	1,092	908	110,104

Aus dem Vergleich dieser zwei Tabellen ergibt sich, daß durch die Stauung Unterschiede im Gewicht, Volumen und Dichte der roten Blutkörperchen auftreten. Tabelle III stellt eben diese Unterschiede dar:

Tabelle III.

Versuchszahl	*p*	*d*	Vol	Q. glob.
1	+ 0,11	+ 0,012	— 10	+ 1037
2	— 0,39	+ 0,014	— 1	+ 138
3	+ 3,35	— 0,006	+ 37	— 4734
4	+ 5,02	— 0,008	+ 52	— 6384
5	+ 0,61	+ 0,001	+ 5	— 408
6	+ 7,29	+ 0,009	+ 60	— 7663
7	— 0,72	+ 0,003	— 9	+ 943
8	+ 3,00	— 0,005	+ 30	— 2897
9	+ 6,45	— 0,006	+ 4	— 6360
10	— 0,09	—	— 2	+ 214

Zusammenfassend ergibt sich aus Tabelle III, daß die Änderungen des Gewichtes, des Volumens und der Dichte der roten Blutkörperchen infolge der künstlichen venösen Stauung beträchtlich sind, aber nicht immer im gleichen Sinne sich abspielen, d. h. manchmal nehmen die Werte zu, während sie andere Male wieder abnehmen.

Die Aufnahme von Wasser (Quellung) von seiten der Erythrocyten kann man in meinen Versuchen aus der gleichzeitigen Zunahme des Volumens und Abnahme der Dichte entnehmen. Dieses Zusammentreffen ergab sich aber nur in vier Versuchen. Nicht einmal die Zunahme des Volumens ist konstant, obwohl sie in sieben Versuchen zutrifft und viel höhere Werte erreicht als die relativen Werte der Abnahme des Volumens, welche in drei anderen Versuchen vorkommt. Ich stimme daher der Meinung *Aiellos* bei, welcher auf Grund anderer Überlegungen behauptet, man dürfe nicht ohne weiteres die Ergebnisse der Arbeiten von *Hamburger*, *Limbeck*, *Grüber* und anderen, welche versuchsweise die CO_2-Spannung im Blute erhöhten, auf die Verhältnisse der venösen Stauung *in vivo* übertragen.

Man kann auch denken, daß die physikalisch-chemischen Veränderungen der Erythrocyten infolge natürlicher Stauung nicht genau den von mir im Versuche beobachteten Veränderungen nach künstlicher, in einem kleinen Venenbezirke rasch erzeugten und nur 15 Minuten lang erhaltenen Stauung entsprechen.

Diese Verhältnisse genügen wahrscheinlich nicht, das hervorzubringen, was unter natürlichen Umständen geschieht, welche sich allmählich entwickeln, lange dauern, den ganzen Körper betreffen und daher verwickelte Anpassungs- und Regulierungsvorgänge auslösen können.

Mir genügt, auf eine so heikle Frage aufmerksam gemacht zu haben und eine sehr einfache Arbeitstechnik angegeben zu haben, welche vielleicht irgendeine nützliche Anwendung finden kann.

Literatur.

1) *G. Aiello*, Influsso della stasi venosa sullo stato chimico-fisico dei globuli sanguigni (siehe auch vom selben Autor: „Über den Einfluß der venösen Stauung auf den Quellungszustand der Blutkörperchen, diese Zeitschr. **124**, 100). — 2) *E. Meneghetti*, Densità e peso dei globuli rossi. I. Metodo sperimentale per la determinazione di questi dati (Atti e Mem. della R. Accademia di Scienze, Lettere ed Arti in Padova **38**, 1922). — 3) *L. Pezzotti*, Peso e densità dei globuli rossi del sangue venoso normale della donna (Giornale di Clinica Medica **2**, 1924). — 4) *Derselbe*, Applicazioni cliniche dell'ematocrito (Il Policlinico Sez. Medica 1924). — Literatur über diesen Stoff siehe in den genannten Arbeiten.

Über die chemische Zusammensetzung des Insulins.

Von

Erhard Glaser und Georg Halpern.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pharmakognostischen Universitäts-instituts in Wien.)

(Eingegangen am 10. Juni 1925.)

Gelegentlich der Besprechung der chemischen Beschaffenheit des Insulins (1) wurde von dem einen von uns der Meinung Ausdruck gegeben, daß man beim Insulin, dem ja fermentative Eigenschaften zukommen, ähnlichen Verhältnissen gegenübersteht, wie sie *Willstätter* (2) bei seinen Reinigungsverfahren mit Enzymen angetroffen hat. *Willstätter* will diese mit den Toxinen zu einer großen Klasse von Stoffen vereinigt wissen, mit deren Ausdehnung und Abstufung sich nur die Eiweißstoffe vergleichen lassen, und sieht das Eigentümliche dieser Klasse in der Entwicklung und Spezifizierung der Partialaffinität. Darauf führt er ihre Wirkung zurück und darauf gründet er seine Methode der Isolierung. Im wesentlichen handelt es sich wohl dabei um ein Abbauprodukt des Eiweißes. Dementsprechend geben auch die reinen Präparate des Insulins keine Eiweißreaktionen bzw. keine Biuret- und Glyoxylsäurereaktion. Von verschiedenen Autoren wurde daher der Meinung Ausdruck gegeben, daß das aktive Prinzip möglicherweise nur an die Eiweißkörper adsorbiert ist. Da aber immer die *Millon*sche und auch wohl die *Pauly*sche Reaktion positiv waren, so war anzunehmen, daß Eiweißspaltprodukte vielleicht polypeptidartig gebunden im Insulin vorliegen. Der Struktur dürfte man daher vielleicht auf diese Weise näher kommen, wenn man zunächst das Studium auf die Erforschung der Endspaltprodukte des Insulins erstrecken würde.

Nach Erlangung der Kenntnis, aus welchen Bausteinen die im Handel vorkommenden Präparate zusammengesetzt sind, werden sich Anhaltspunkte gewinnen lassen, welche von diesen als wichtig anzusehen sind, schließlich wird man, wenn genügende Untersuchungen vorliegen, erwägen können, ob dieselben für eine synthetische Darstellung in Frage kommen.

Beobachtungen über die Bedeutung gewisser Eiweißspaltprodukte bzw. Aminosäuren für bestimmte Funktionen liegen bereits vor. *Sure*,

Barnett (3) fanden, daß für das Wachstum Prolin notwendig ist, aber auch Tryptophan (4). *Mitchell* (5) hat nachgewiesen, daß ein Futter, welches genügend Cystin enthält, geeignet ist, gutes Wachstum hervorzurufen; er konstatierte aber auch, daß während der Wachstumsperiode Cystin durch Taurin ersetzt werden kann. Es scheint also in diesem Falle, daß es weniger auf den Cystingehalt als auf den Schwefelgehalt ankommt. *Seuffert* (6) hat gezeigt, daß verfütterte Aminosäuren eine eiweißsparende Wirkung ausüben. *Jakoby* (7) konnte nachweisen, daß die Organismen zur Bereitung von Fermenten Aminosäuren wie Asparagin und insbesondere Leucin notwendig haben und daß Monosaccharide von bestimmter sterischer Konfiguration, insbesondere Glucose und deren Abbauprodukte wie Brenztraubensäure u. a., die Fermentbildung fördern. Es wäre daher dies immerhin ein Weg, um dem Organismus entsprechende Baustoffe zuzuführen.

Was den genaueren chemischen Aufbau anlangt, so hält *Dale* (8) das Insulin für ein höchst komplexes Eiweißderivat, während *Collip* (9) dem entgegengesetzt der Vermutung Ausdruck gibt, daß es sich beim Insulin um eine Guanidinoverbindung handeln könne. *Ganassini* (10) fand im selbst hergestellten Insulin ziemlich große Mengen von Phosphor, und nach Verseifung mit 20proz. KOH gab die stark angesäuerte Lösung nach Zusatz von Jodjodkalium die *Florence*sche Reaktion auf Cholin, während der Rückstand freie Phosphorsäure enthielt, woraus Verfasser schließt, daß im Insulin ein dem Jecorin nahestehendes Phosphatid enthalten ist. Schon früher hat *Petschacher* (11) die Chemie des Pankreas zu durchforschen versucht und vermochte eine Substanz von der Zusammensetzung $C_{14}H_{31}N_3O_8$ zu isolieren, welche kristallisierte und weder *Millon*sche noch die Xanthoprotein-, noch die *Dankiewicz*sche und *Mörner*sche Reaktion gab, jedoch blutzuckererniedrigend wirkte. Auch konnte er l-Leucin aus dem Pankreas isolieren.

Vorerst wurde, um festzustellen, ob die im Insulin vorhandenen Aminosäuren frei oder polypeptidartig gebunden sind, der Aminostickstoff vor und nach der Hydrolyse nach der Formoltitrationsmethode nach *Sörensen* bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde zweimal zu 0,05 g eines stark wirksamen, schön weißen Insulinpräparats [Phiag[1])] eingewogen. In der ersten Probe wurde direkt der Gesamtaminostickstoff mit Formol bestimmt, dagegen die zweite vorerst mit 20 Proz. HCl hydrolysiert und nachher ebenfalls der Formoltitration unterworfen. Da nun das Insulin vor der Hydrolyse nur 0,25 ccm n/5 NaOH gleich 0,7 mg Aminostickstoff enthalten hat, dagegen nach der Hydrolyse für die gleiche Insulinmenge 2,87 ccm n/5 NaOH entsprechend 8,036 mg Aminostickstoff verbraucht wurde, ist der Beweis geliefert, daß fast der ganze Aminostickstoff in polypeptidartiger Bindung im Insulin vorhanden ist.

Zur näheren Untersuchung auf Aminosäuren stand uns ein nicht besonders wirksames Insulin zur Verfügung, das in folgender Weise nach dem Verfahren von *van Slyke* (12) analysiert wurde.

---

[1]) Das Insulin wurde bereitwilligst von den Firmen Phiag und Chemosan beigestellt, wofür diesen Firmen auch hier bestens gedankt wird.

Das Insulin wurde der Dialyse unterworfen, um es von den anorganischen Bestandteilen, hauptsächlich von Ammonsalzen zu befreien; nach der Dialyse wurde es im Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockne eingedampft und stellte nun im trockenen Zustande ein lichtbraun gefärbtes Pulver, welches frei von anorganischen Bestandteilen war, dar. Von diesem Pulver wurden 3 g eingewogen und in einem Erlenmeyerkölbchen mit 60 ccm 20proz. HCl versetzt, wobei es sich klar auflöste. Hierauf wurde es einer zehnstündigen Hydrolyse durch Kochen unter Rückflußkühlung unterworfen. Nachher wurden zur Bestimmung des Gesamtaminostickstoffs nach *van Slyke* Proben entnommen und wieder durch 7 Stunden hydrolysiert. Dieser Vorgang wurde bis zur Konstanz des Aminostickstoffgehalts wiederholt, wozu eine 31stündige Hydrolysezeit notwendig war. Für jede Bestimmung wurden 2 ccm verwendet, und als Endwert wurde bei 25° C und 748 mm Barometerstand 20,7 ccm gefunden. Für diese Bestimmungen wurden zusammen 8½ ccm entnommen. Die übriggebliebene Hydrolyseflüssigkeit wurde im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit Wasser aufgenommen und auf 150 ccm aufgefüllt, welche 2,575 g Substanz enthielten. Mit diesen wurde der Gang nach *van Slyke* fortgesetzt und dabei die in nachstehender Tabelle enthaltenen Werte gefunden, wobei in der Regel zwei Bestimmungen gemacht und das Mittel daraus gezogen wurde. Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs wurden dreimal 10 ccm entsprechend 0,515 g Substanz verbraucht, weshalb für die übrige Analyse noch 2,060 g Substanz übrigblieben.

	Verwendete Untersuchungssubstanz g	Verbrauchte Menge n/10 H_2SO_4 bei den Kjeldahlbestimmungen ccm	N nach *van Slyke* ccm	N im Insulin Proz.
Gesamtamino-N	0,1	—	20,7 (25°, 748 mm)	11,3
Gesamt-N	0,1416	17,4	—	14,2
Gesamtammoniak-N . .	2,060	13,9	—	0,8
Melanin-N	2,060	15,2	—	0,9
Arginin-N	1,030	6,5	—	1,7
Gesamt-N der Basen . .	1,030	18,8	—	2,6
Cystin-N	nicht vorhanden			—
Amino-N der Basen . .	0,412	—	8,8 (22°, 746 mm)	1,2
Histidin-N	berechnet aus $^3/_2$ (Nicht-Amino-N der Basen — $^3/_4$ Arginin-N) . .			0,4
Lysin-N	berechnet aus Total-N — (Arginin-N + Cystin-N + Histidin-N) . . .			0,5
Gesamt-N im Filtrate der Basen	0,343	24,4	—	10,0
Amino-N im Filtrate der Basen	0,141	—	20,0 (22°, 746 mm)	7,3

Daraus ergeben sich für die nach *van Slyke* bestimmbaren Aminosäuren nachfolgende Prozentzahlen:

	In Proz. N bezogen auf das Insulin	In Proz. N bezogen auf Gesamt-N
Ammoniak-N	0,8	5,63
Melanin-N	0,9	6,4
Cystin-N	0,0	0,0
Arginin-N	1,7	11,9
Histidin-N	0,4	2,3
Lysin-N	0,5	3,5
Amino-N im Filtrate der Basen	7,8	54,23
Nichtamino-N im Filtrate der Basen . .	2,2	15,5
Gesamt-N (Summe) .	14,3 (Gefunden 14,2)	99,5

Da, wie bereits erwähnt, das Leucin zur Bildung der Fermente im Organismus als nötig sich erwies, so wurde auch nachgesehen, ob dieses im Insulin vorhanden ist. Es wurden 2 g Insulin in 15 ccm konzentrierter Salzsäure im Ölbade unter Rückflußkühlung 6 Stunden gekocht und sodann viermal im Vakuum bei etwa 40° unter erneutem Wasserzusatz eingedampft, sodann mit Wasser aufgenommen und vom schwarzbraunen Niederschlag abgegossen. Mit NaOH schwach alkalisch gemacht und etwas eingeengt, schied die Flüssigkeit keinen kristallinischen Niederschlag ab, was auf Abwesenheit von Tyrosin hindeutet. Daraufhin zu untersuchen, schien deshalb von Interesse, da ja von *Glaser* und *Wittner* (13) im Insulin das Vorhandensein von Oxydationsfermenten festgestellt wurde und für dieselben das Tyrosin einen Angriffspunkt hätte abgeben können. Erst beim starken Eindampfen auf wenige Kubikmillimeter setzte sich ein reichlicher kristallinischer Niederschlag ab, in dem man mikroskopisch außer Kochsalzkristallen typische Leucinkugeln nachweisen konnte. Zur weiteren Verarbeitung und Reinigung des Leucins konnte leider nicht geschritten werden, da die Menge desselben viel zu gering war.

Mit Rücksicht auf die von *Ganassini* (10) gemachte Beobachtung, daß in seinem, von ihm hergestellten Insulin sich Cholin vorfindet, wurde an einem weitgehend über das Pikrinsalz gereinigten Insulin (Phiag) auf Cholin nachgesehen, indem das Insulin einer Hydrolyse mit 20proz. NaOH unterworfen wurde, nachher mit HNO_3 sauer gemacht und mit Jod-Jodkalium auf *Florence*sche Kristalle geprüft. Der Versuch fiel negativ aus; auch konnte Phosphorsäure nicht nachgewiesen werden.

Wenn wir das Ergebnis der Untersuchung zu analysieren versuchen, so können wir aus dem Vorhandensein von Lysin, Arginin und Histidin,

welche zusammen in vielen tierischen Eiweißkörpern vorkommen und sich überall, auch da vorfinden, wo unter Einwirkung hydrolytischer Kräfte Organeiweiß einer gesteigerten Autolyse unterliegt, schließen, daß wir auch im Insulin ein Eiweißabbauprodukt vor uns haben.

Tatsächlich haben auch *Kutscher* und *Lohmann* (14) diese Körper im autolysierten Pankreas nachgewiesen. Was speziell das Lysin anlangt, so ist von Arbeiten, die sich mit den spezifischen Aufgaben des Lysins im Haushalt der Tiere befassen, wie von *Osborne, Lafayette, Mendel* und *Wakemann* (15) sowie *Abderhalden* (16) bekannt, daß es als eine lebenswichtige Aminosäure anzusehen ist, wenn auch die spezifische Funktion desselben nicht feststeht. Auch von Arginin steht fest, daß es eine äußerst wichtige Aminosäure ist und bereits von *Kutscher* (17) im verdaulichen Eiweiß des Pankreas und im Hefeeiweiß [*Schroeder* (18)] nachgewiesen wurde. Bei dem Zusammenhang, der vielfach von neoplastischem Gewebe, wie es bei bösartigen Geschwülsten auftritt, mit der Insulinwirkung gezogen wird, ist es nicht uninteressant, daß, wie in diesem auch in jenem nicht unerhebliche Mengen Arginin gefunden werden. Was die biologische Bedeutung des Arginins im intrazellulären Stoffwechsel anlangt, so soll bei einem Freiwerden desselben aus dem Eiweißverband infolge seiner reaktionsfähigen basischen Gruppen die p_H-Ionenkonzentration sich erheblich verändern. Wird in Erwägung gezogen, daß die fermentativen Reaktionen durch die letztere wesentlich beeinflußt werden, ja daß dieselben durch diese direkt aktiviert werden sollen, so kann das Vorhandensein von Arginin im Insulin auch in dieser Hinsicht bedeutungsvoll sein. Bekanntlich wird ja auch die Trypsinverdauung des Eiweißes durch Arginin, wie auch durch freies Alkali fördernd beeinflußt, wenn ein gewisses Optimum der Konzentration nicht überschritten wird [*Lawrow* (19)]. Hinzu kommt noch, daß in der Leber verschiedener Tiere ein für die Argininabspaltung eingestelltes Ferment [*Kossel* und *Dakin* (20)], die Arginase, sich befindet und dadurch auch im Körper die Möglichkeit besteht, die oben angeführte Änderung der p_H-Ionenkonzentration zu bewirken und dadurch im Sinne einer Aktivierung die fermentativen Prozesse der Organe zu beeinflussen. Es wird durch den Nachweis überdies die eingangs erwähnte Vermutung *Collips* vollends bestätigt, daß es sich im Insulin wenn auch nicht um eine Guanidinoverbindung allein, so doch um eine polypeptidartige Verbindung derselben mit anderer Aminosäuren handelt.

Auch bezüglich des Histidins ist uns bekannt, daß es im carcinomatösen Gewebe, im Autolysat des Pankreas und der Hefe sowie im Muskelpreßsaft vorkommt. Es lassen sich auch hier sicherlich Zusammenhänge mit dem Zuckerumsatz konstatieren, wenn man erwägt, daß nach den Untersuchungen von *Windaus* und *Knoop* (21) der Imidazolkern, und beim Histidin handelt es sich um eine Imidazolverbindung, auch im tierischen und pflanzlichen Organismus aus Hexosen entstehen dürfte. Diese Forscher vermochten aus Hexosen über Glycerinaldehyd, Methylglyoxal, Formaldehyd und Ammoniak, und so vollzieht sich ja der Zuckerumsatz in der Zelle nach *Neuberg* (22), Methylimidazol zu bilden. Man kann sich daher vorstellen, daß diese lebenswichtige Aminosäure fehlt bzw. geringer wird, wenn der Zuckerstoffwechsel gestört ist. Vom Histidin weiß man, daß die Verkettung im Eiweißmolekül oder zu Polipeptiden mit der freien a-Aminogruppe erfolgt und die Imidazolgruppe frei ist. Diese letztere bedingt mit der freien o-Aminogruppe des Lysins und der Guanidinogruppe des Arginins die

basischen Eigenschaften der Proteine. Bei den untersuchten Insulinen war die *Pauly*sche Reaktion positiv, also die Imidazolgruppe als frei erwiesen.

Der Nachweis des Melaninstickstoffs war insofern auffällig, als das von einigen Forschern als Muttersubstanz desselben angesehene Tyrosin nicht nachweisbar ist.

Im großen und ganzen zeigte es sich, daß die nachgewiesenen Aminosäuren, die allerdings auch in vielen Eiweißkörpern vorkommen, nicht die Hauptmenge der Aminosäuren im Insulin bilden, da sich diese in jenem Anteile vorfindet, die durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt, daher durch das Verfahren von *van Slyke* nicht konstatiert werden konnte. Nichtsdestoweniger kann aber doch auf einige von denselben geschlossen werden, auf einige wurde direkt untersucht. *Osborne, Leavenworth* und *Brautlecht* (23) haben gezeigt, daß der Ammoniakstickstoff gewöhnlich gleich ist den Dicarbonsäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, mit denen er ursprünglich im Eiweißmolekül in Form von Säureamidradikalen gebunden sein dürfte. *Schultze* (24) hat übrigens festgestellt, daß sich Arginin hauptsächlich im Asparagin umwandelt. Cholin war nicht nachweisbar; wohl aber Leucin, das *Jacoby*, wie erwähnt, als Baustein für Fermente als unerläßlich erklärt. Über die Bedeutung des Leucins im Insulin lassen sich auf Grund der chemischen Untersuchung keine Vermutungen aufstellen, weil das l-Leucin, wie *Petschacher* (11) gezeigt hat, blutzuckersteigernd wirkt und seiner Ansicht nach sogar die Insulinpräparate in ihrer Wirkung abschwächen kann. Außerdem soll ja nach *Müller* (25) die Zuckerbildung im Organismus aus Eiweiß durch das Leucin geschehen. Demgegenüber würden die Angaben von *Jacoby* das Vorhandensein von Leucin, das ja ein normaler Bestandteil des Pankreas ist, genügend erklären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der chemischen Untersuchung im Insulin neben Melanin von den Aminosäuren Lysin, Arginin, Histidin nachgewiesen wurden. Die größere Menge der Aminosäuren befindet sich jedoch in dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Anteile der Aminosäuren, von denen mit Rücksicht auf die geringe Menge des Untersuchungsmaterials nur auf einige untersucht, und unter denen Leucin festgestellt, Glutamin und Asparaginsäure erschlossen, dagegen Tyrosin und Cholin nicht nachgewiesen werden konnten. Dieselben sind offenbar polypeptidartig gebunden, da die *Millon*sche und *Pauly*sche Reaktion positiv, die anderen dagegen, wie Biuret, Glyoxyl, Xanthoprotein und andere negativ ausfielen. Die polypeptidartige Bindung wurde auch durch die Formoltitration bestätigt, die ergab, daß nach dem Kochen mit starker Säure der Aminostickstoff anstieg. Ein hochmolekularer Eiweißkomplex (*Dale*) liegt sicherlich nicht vor, dagegen wird die Annahme *Collips*, daß es sich um eine Guanidinoverbindung aber noch mit anderen Aminosäuren (Polypeptid) handelt, bestätigt. Die nachgewiesenen Aminosäuren gelten als lebenswichtig und können durch ihr Vorhandensein und ihr Fehlen, wie aus den in der Literatur vorliegenden Beobachtungen hervorgeht, wichtige Funktionen im Haushalte des tierischen und

pflanzlichen Organismus beeinflussen. Bemerkenswert ist noch, daß die vorerwähnten Aminosäuren, die im Insulin nachgewiesen wurden, auch im Pankreas, carcinomatösen Gewebe und im Hefepreßsaft vorkommen, von denen ja bekannt ist, daß sie eine glykolytische Wirkung ausüben.

Literatur.

1) *E. Glaser*, Pharmaz. Monatshefte 1924, H. 1, S. 2. — 2) *Willstätter*, B. B. 1922, S. 2601. — 3) *Sure*, *Barnett*, Journ. of biol. Chem. **59**, 1924. — 4) *Dieselben*, ebendaselbst **59**, 1924. — 5) *M. L. Mitchell*, Australian Journ. of exper. biol. a. medical science **1**, 5, 1924. — 6) *Rudolf W. Seufert*, Zeitschr. f. Biol. **80**, 381, 1924. — 7) *Martin Jacoby*, diese Zeitschr. **79**, 35; **80**, 357; **81**, 332; **83**, 74; **84**, 358. — 8) *H. H. Dahle*, Lancet **204**, 989, 1923. — 9) *J. B. Collip*, Journ. of biol. Chem. **57**, 65. — 10) *D. Ganassini*, Boll. d. soc. med. chirurg. **86**, 105, 1924. — 11) *L. Petschacher*, diese Zeitschr. **141**, 109. — 12) *Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmethoden **5**/2, 1011. — 13) *E. Glaser* und *L. Wittner*, diese Zeitschr. **145**, 279, 1924. — 14) *Kutscher* und *Lohmann*, Zeitschr. f. phys. Chem. **89**, 313. — 15) *Osborne*, *Lafayette*, *Mendel* und *Wakemann*, Journ. of biol. Chem. **17**, 325; **25**, 1. — 16) *Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **96**, 1. — 17) *Kutscher*, ebendaselbst **44**, 381. — 18) *Schroeder*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 389. — 19) *Lawrow*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 302. — 20) *Kossel* und *Dakin*, ebendaselbst **40**, 565. — 21) *Windaus* und *Knoop*, Berl. Ber. **38**, 1166. — 22) *C. Neuberg*, Handb. d. Biochem., II. A., **2**. Jena 1925. — 23) *Osborne*, *Leawenworth*, *A. Brautlecht*, Amer. Journ. of biol. **23**, 194. — 24) *Schultze*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**, 128. — 25) *Müller* nach *Hammersten*, Lehrb. d. phys. Chem. 1904, S. 251.

Über eine neuartige Anwendung der Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure zur Bestimmung der Harnsäure in Milch und Blut.

Von

G. Reif.

(Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium des Reichsgesundheitsamts, Berlin.)

(Eingegangen am 15. Juni 1925.)

Bei einem Versuch, Eiweißstoffe in Lebensmitteln unter Verwendung von *Phosphorwolframsäure* nachzuweisen, wurde die Wahrnehmung gemacht, daß neben der Fällungsreaktion in gewissen Lösungen auch eine *violette Färbung* auftrat. Die Vermutung, daß die Ursache dieser Erscheinung in einer Verunreinigung der verwendeten Wolframsäure zu suchen sei, ließ sich bald bestätigen. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung eines Präparats von ortho-Natriumwolframat, dessen Hersteller nicht bekannt war, eine starke Violettfärbung hervorgerufen wurde, während das „orthowolframsaure Natrium" von *Kahlbaum* nur eine äußerst schwache, dasjenige „zur Analyse mit Garantieschein" der nämlichen Firma überhaupt keine Färbung ergab.

Um das Auftreten dieser Farbenerscheinung zu ergründen, wurde eine größere Reihe von Versuchen unternommen, die schließlich zu dem Ergebnis führten, daß als die die Färbung verursachende Verunreinigung des Wolframats die Molybdänsäure erkannt wurde. Wurden Phosphorwolframsäure und Molybdänsäure gleichzeitig angewendet, so entstand in der betreffenden Lösung sofort eine äußerst intensive Violettfärbung. Diese blieb dagegen aus, wenn mit Phosphormolybdänsäure allein gearbeitet wurde. Zur Entstehung der Violettfärbung ist demnach sowohl *Molybdänsäure* wie *Wolframsäure* notwendig; ebenso ist die Gegenwart der *Phosphorsäure* Bedingung.

Durch diese Versuche war zwar die qualitative Zusammensetzung des Reagens, das die Violettfärbung herbeigeführt hatte, geklärt, dagegen mußte noch erforscht werden, welcher Stoff in dem untersuchten Lebensmittel die Farbenerscheinung ausgelöst hatte. Zu

diesem Zwecke wurden zunächst mehrere Eiweißstoffe und Alkaloide, für die die Phosphorwolframsäure als Nachweismittel dient, geprüft, später noch weitere Stoffe, deren Verhalten für die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Versuche von Interesse war. Dabei gab im großen und ganzen nur eine geringe Anzahl der geprüften Stoffe die Violettfärbung, darunter die *Gerbsäure.* Diese wurde auch als die Ursache der violetten Färbung in dem untersuchten Lebensmittel erkannt. Hierüber wird an anderer Stelle eingehender berichtet werden.

Unter den folgenden Stoffen ergaben *keine* Violettfärbung:

Methylalkohol, Äthylalkohol, Formaldehyd, Acetaldehyd, Ameisensäure, Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Milchsäure, Oxalsäure, Salicylsäure, Oxybuttersäure, Crotonsäure.

Glycerin, Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose, Glykogen.

Ammoniak, Trimethylamin, Butylamin, Benzylamin, Formamid, Acetamid, Propionamid, Acetanilid, Oxamid.

Glykokoll, Alanin, Leucin, Sarkosin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin, Betain, Lysin, Hippursäure, Cholin.

Pyrrol, Prolin, Chinolin, Picolin, Imidazol, Histidin.

Harnstoff, Guanidin, Carbamidsäure, Urethan, Cyanursäure, Biuret, Succinimid.

Cocain, Nicotin, Chinin, Coniin, Pyridin, Morphin.

Phenol, Tyrosin, Vanillin, Nitrophenol, Chinon, Anthrachinon.

Xanthin, Guanin, Coffein, Theobromin, Hypoxanthin, Methyltrichlorpurin, Allantoin.

Globulin, Hühnereiweiß, Pepton-Witte, Casein, Laktalbumin, Blutalbumin, Protoalbumose, Deuteroalbumose.

Eine *schwache* Violettfärbung riefen hervor:

Benzaldehyd, Anilin, Toluidin, p-Amidophenol, Thymol, Naphthol, Naphthylamin, Orcin, Xylidin, Aceton, Cystin, Kreatin, Kreatinin, Tryptophan, Carvacrol, Resorcin, Dextrin.

Eine *starke* Violettfärbung zeigten:

Xylenol, Kresol, Kreosol, Pyrogallol, Guajacol, Hydrochinon, Brenzcatechin, Gallussäure, Gerbsäure, Adrenalin, Eugenol, *Harnsäure,* Alloxan, Alloxanthin, Indol, Skatol, Thiosinamin, Xanthogensaures Kalium.

Natriumbisulfit, Zink und Salzsäure, Schwefelwasserstoff.

Unter den aufgeführten Stoffen wurden viele gewählt, die in physiologischen Flüssigkeiten des menschlichen und tierischen Körpers vorkommen, z. B. in Milch und in Blut, aber nur wenige unter ihnen rufen eine positive Reaktion hervor, während sich die meisten gegenüber dem Reagens indifferent verhalten. Zu den stark positiv reagierenden gehört in erster Linie auch die *Harnsäure*, eine Beobachtung, die auf das Gebiet der Harnsäurebestimmung hinüberleitet.

Zurzeit gibt es überhaupt noch keine Bestimmungsmethode für geringe Mengen von Harnsäure, die man als vollkommen fehlerfrei ansprechen kann, wenn auch die von *Folin*, *Benedict* und ihren Mitarbeitern ausgearbeiteten Verfahren einem solchen Wunsch sehr nahe kommen. In der Hoffnung, der Erreichung dieses Zieles einen weiteren Schritt vorwärts zu verhelfen und neuen Anregungen zu dienen, wurden die folgenden Versuche ausgeführt.

Als die günstigste *Zusammensetzung* des *Reagens* wurde in zahlreichen Versuchen die folgende erkannt:

Natriumwolframat	3,00 g
Natriumphosphat	2,00 g
Molybdänsäure	0,05 g
Wasser	25,00 g

Als Natriumwolframat wurde „Marke Kahlbaum zur Analyse“, als Molybdänsäure „Marke Kahlbaum“ und als Natriumphosphat dasjenige des „D. A. B. 5“ gewählt.

Das obige Gemisch wurde durch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade in Lösung gebracht, dann abgekühlt und mit konzentrierter Salpetersäure tropfenweise genau bis zur Neutralisation (Prüfung mit Lackmuspapier) versetzt.

Wurde das Reagens in dieser Weise hergestellt und darauf geachtet, daß die Zugabe der Salpetersäure gerade bis zur Neutralisation erfolgte, so war es unbegrenzte Zeit haltbar. Zur Ausführung der Reaktion wurden zu 10 ccm der zu prüfenden Lösung mit der Pipette zuerst 0,5 ccm 10proz. Salzsäure und dann ebenfalls mit der Pipette 1 ccm des Reagens gegeben. Diese Mischung wurde auf der Flamme rasch bis zum beginnenden Sieden erhitzt und hierauf bei gewöhnlicher Temperatur stehengelassen. Bei Anwesenheit von Harnsäure trat je nach der vorhandenen Menge entweder bereits während des Erhitzens oder sofort danach die Violettfärbung auf.

Ausschlaggebend für die Brauchbarkeit des Reagens als Bestimmungsmittel für Harnsäure scheint der äußerst geringe Gehalt an Molybdänsäure zu sein, der zur Herbeiführung der Reaktion notwendig ist. Gerade diesem Umstande dürfte es zu verdanken sein, daß die Anwesenheit von Stoffen nicht stört, die die Anwendung des sogenannten „Phenolreagens“ von *Folin* für die Harnsäurebestimmung ausschließt. Dieses enthält bekanntlich ebenfalls Phosphorwolframsäure und Molybdänsäure, wenn auch in wesentlich anderem Verhältnis und bei anderer Anwendungsform als das hier beschriebene.

Zu den Stoffen, die die neue Reaktion nicht beeinträchtigen, gehört in erster Linie das *Phenol* selbst und ferner seine Alaninverbindung, das *Tyrosin*. Besonders die letztere Beobachtung ist wesentlich, da das Tyrosin ein Abbauprodukt von Eiweißstoffen darstellt, das in

menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten häufig angetroffen wird.

Ferner gehören zu den Stoffen, deren indifferentes Verhalten gegenüber dem neuen Reagens wegen ihres Vorkommens in Milch und Blut von Wichtigkeit ist, die *Peptone*, *Globulin*, *Blut-* und *Laktalbumin* und *Casein*.

Hingegen zählen zu den Stoffen, mit deren störender Wirkung zu rechnen ist, das *Indol* und seine Derivate, das *Kresol* und die *Polyphenole*.

In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten dieser Stoffe mit dem Verdünnungsverhältnis, in dem sie mit dem neuen Reagens in wässeriger Lösung noch deutlich nachweisbar sind, zusammengestellt, wobei zum Vergleich auch die Harnsäure selbst aufgeführt ist:

Aceton	1 : 20
Cystin	1 : 400
Resorcin	1 : 500
Kreatinin	1 : 600
Tryptophan	1 : 800
p-Kresol	1 : 1200
Kreatin	1 : 2000
Alloxan	1 : 4000
Alloxanthin	1 : 5000
Indol	1 : 250000
Skatol	1 : 250000
Hydrochinon	1 : 300000
Brenzcatechin	1 : 300000
Gallussäure	1 : 500000
Gerbsäure	1 : 500000
Adrenalin	1 : 500000
Harnsäure	1 : 150000

Aus der geringen Empfindlichkeit bei vielen der oben angeführten Stoffe in wässeriger Lösung ist bereits ersichtlich, daß ihre Anwesenheit bei einer Harnsäurebestimmung praktisch gar nicht in Erscheinung treten wird. Dies gilt namentlich für Kreatin, Kreatinin, Tryptophan, Cystin und Aceton. Andere dagegen, wie das Indol und seine Derivate, sowie die Polyphenole müssen, wenn mit ihrer Anwesenheit in größerer Menge zu rechnen ist, beseitigt werden, oder es muß die Harnsäure auf irgend eine Weise isoliert werden. Dabei hat es sich als günstig herausgestellt, daß sich sowohl Indol und Skatol als auch Phenole, wie p-Kresol, Xylenol (und übrigens auch das Phenol selbst), durch organische Lösungsmittel verhältnismäßig leicht entfernen lassen. Dazu eignet sich am besten *Chloroform*, während beim Ausschütteln mit Äther Nachteile insofern beobachtet wurden, als kleine, in der wässerigen Lösung verbliebene Äthermengen ein geringes Verblassen der Violettfärbung veranlaßten, was vermutlich auf Oxydationserscheinungen

zurückzuführen ist. Mit Chloroform konnten sowohl zugesetztes Xylenol und Kresol als auch Indol und Skatol vollständig wieder entfernt werden, so daß die ausgeschüttelte wässerige Lösung keine Violettfärbung mehr ergab, während die Harnsäure selbst in Chloroform vollkommen unlöslich ist, so daß Verluste beim Ausschütteln nicht zu befürchten sind. Dagegen wurden die Polyphenole, Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon, Phloroglucin und Adrenalin vom Chloroform nicht erfaßt. Darin liegt ein Nachteil für die Anwendung der Violettreaktion, den sie allerdings mit der *Folin*schen Methode gemeinsam hat.

Daß Tyrosin und Tryptophan mit Chloroform nicht entfernt werden, ist wegen ihrer Unwirksamkeit gegenüber dem Reagens belanglos.

Man kann nun die Einwendung machen, daß nur die „freien" Phenole in die Chloroformlösung übergeführt werden können, während die „gebundenen" in der wässerigen Lösung verbleiben. Dem ist entgegenzuhalten, daß die in Frage kommenden phenolartigen Verbindungen im Harn und wahrscheinlich auch im Blut überwiegend in freiem Zustande[1]) vorhanden sind und daß, wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, das p-Kresol, um das es sich in erster Linie handelt, eine Nachweisbarkeit in wässeriger Lösung besitzt, die 100mal kleiner ist als diejenige der Harnsäure, so daß anzunehmen ist, daß sich im Verlauf der Harnsäureanalyse die unter Umständen im Blute vorhandenen äußerst geringen Mengen an Kresol dem Nachweis so gut wie vollständig entziehen. In Milch kommen Phenole überhaupt nicht vor, außerdem wirkt hier, wie später noch gezeigt werden wird, der für die Eiweißfällung verwendete Tetrachlorkohlenstoff bereits reinigend.

Als Bestandteil des Blutes ist ferner das *Indikan* [Indoxylschwefelsäure[2])] zu erwähnen, das als Derivat des Indols vermutlich ebenfalls mit dem Reagens eine violette Färbung gibt. Seine Menge soll bei gesunden Menschen 0,02 bis 0,05 mg in 100 ccm Blut, bei kranken höchstens das Dreifache davon betragen. Wenn auch so geringe Mengen die Ausführung der Harnsäurebestimmung praktisch nicht beeinträchtigen, so soll doch als vorteilhaft bemerkt werden, daß auch das Indikan nach seinem Zerfall in saurer Lösung durch Chloroform beseitigt werden kann.

Des weiteren spielt unter den Gallenfarbstoffen des Blutes das *Bilirubin*, vermutlich ein Oxypyrrolderivat, eine Rolle. Es soll unter normalen Verhältnissen in einer Menge von etwa 0,5 mg in 100 ccm Blutserum vorkommen. Seine Beseitigung im Verlaufe der Harnsäure-

[1]) Vgl. *F. F. Tisdall*, The Journ. of Biol. Chem. **44**, 409, 1920.

[2]) Leider stand mir weder Indikan noch Bilirubin zur Nachprüfung zur Verfügung.

analyse wird insofern erleichtert, als es an ein Protein gebunden sein soll, worauf zurückgeführt wird, daß es bei der Eiweißausfällung zum größten Teile mitgerissen wird. Da das Pyrrol im Gegensatz zum Indol keine Violettfärbung hervorruft, ist es an sich schon fraglich, ob ein Oxyderivat desselben eine nennenswerte Färbung erzeugt. Auch das Bilirubin ist übrigens in Chloroform löslich. Das gilt auch vom *Cholesterin*, das jedoch nur selten im Blute beobachtet wird.

Wichtig ist ferner, daß *Casein*, selbst in großen Mengen, mit dem Reagens keine Violettfärbung hervorruft, ebensowenig *Lactalbumin* und *Blutalbumin*. Dieser Vorteil gegenüber der *Folin*schen Methode, bei der man zuweilen bei Anwesenheit dieser Stoffe leichte Blaufärbungen beobachten soll, dürfte in erster Linie dem Umstande zuzuschreiben sein, daß Casein wie Albumin zu wenig Cystin und Tryptophan zur Herbeiführung einer Violettfärbung als Bausteine enthalten. Beim Casein kommt noch hinzu, daß sich das darin enthaltene Tyrosin indifferent verhält. Möglich ist auch, daß hier das Arbeiten in saurer Lösung entgegen der für die *Folin*sche Methode benötigten alkalischen günstig wirkt.

Auch in *technischer* Hinsicht zeigt das Violettreaktionsverfahren einige Vorzüge. So sind vor allen Dingen die völlige *Klarheit* und die *lange Haltbarkeit* der *violetten Lösung* sowohl bei der Ausführung der Reaktion in wässeriger Lösung wie in Milch und Blut hervorzuheben. Gewöhnlich erreicht die violette Färbung etwa 2 Stunden nach der Vornahme der Reaktion ihre höchste Intensität und bleibt dann längere Zeit konstant, ohne daß sich dabei die Spur eines Niederschlages bildet. Bei wässerigen Lösungen bleibt die Farbstärke während etwa 4 Wochen unverändert, zumal wenn die Lösungen verschlossen aufbewahrt werden; erst dann beobachtet man ein geringes Abnehmen der Farbtiefe, entsprechend einer Abnahme um etwa 0,5 mg Harnsäure in 100 ccm. Bei Milch hält sich die Farbstärke mehrere Tage, bei Blut 1 bis 2 Tage konstant.

Da, wie oben angegeben, eine Beeinträchtigung der Reaktion durch Eiweißstoffe, die unter Umständen nicht vollständig ausgefällt worden waren, nicht eintritt, so wird in vielen Fällen auf eine Isolierung der Harnsäure verzichtet werden können, besonders dann, wenn es sich um Flüssigkeiten handelt, in denen keine Störung der Reaktion durch die Anwesenheit größerer Mengen von Phenol- und Indolderivaten zu befürchten ist. Dies trifft aber für die Bestimmung der Harnsäure in der Milch in der Regel, für diejenige im Blut sehr häufig zu. In der Praxis kann hiervon besonders in solchen Fällen Gebrauch gemacht werden, in denen die Angabe der gefundenen Harnsäuremenge in halben Milligrammen auf 100 ccm genügt. Auf diese Weise würde gleichzeitig erreicht werden, daß ein Verlust an Harnsäure infolge

des langwierigen Isolierungsverfahrens vermieden wird. Auf den Vorteil einer direkten Prüfung auf Harnsäure ist schon von mehreren Seiten, z. B. von *C. Maase* und *H. Zondek*[1]) hingewiesen worden.

Als weiterer technischer Vorteil kommt bei dem Violettreaktionsverfahren noch hinzu, daß die angewendete Phosphorwolframsäure in saurer Lösung bereits selbst eiweißfällend wirkt, worauf bei der Beschreibung der Arbeitsweise noch näher eingegangen werden wird. Dabei bleibt die Harnsäure vollständig in Lösung, wie durch Versuche festgestellt werden konnte.

Als ein Nachteil gegenüber der *Folin*schen Methode könnte das Arbeiten in der Wärme und möglicherweise auch in saurer Lösung angesehen werden. Die Befürchtung jedoch, daß dadurch die „gebundene" Harnsäure frei wird, ist, wie die Ergebnisse der unten angeführten Beispiele zeigen, überflüssig. Dies konnte allerdings aus den Versuchen über die Aufspaltung gebundener Harnsäure von *Stanley R. Benedict*[2]) vorausgesehen werden. Dieser Autor beschreibt nämlich die „gebundene Harnsäure" als eine äußerst stabile Verbindung, die erst nach längerem Erhitzen und weitgehendem Eindampfen in salzsaurer Lösung zerlegt wird. Das rasche und kurze Erhitzen einer Flüssigkeitsmenge von 10 ccm mit 0,5 ccm 10proz. Salzsäure kann kaum eine Aufspaltung der vorhandenen gebundenen Harnsäure herbeiführen. So zeigte z. B. eine Rinderblutanalyse eine Harnsäuremenge von 0,5 mg in 100 ccm Blut, eine Menge, die sicherlich nicht über der Norm liegt, während der Wert der im Rinderblut vorhandenen gebundenen Harnsäure nach der Literatur 5 bis 6 mg beträgt.

Beim Violettreaktionsverfahren scheint die *untere Grenze* der Nachweisbarkeit der Harnsäure bei 0,5 mg in 100 ccm Flüssigkeit zu liegen. Hier bekommt man noch eine deutlich wahrnehmbare hellviolette Färbung. Diese nimmt dann entsprechend der vorhandenen Harnsäuremenge an Intensität zu, wobei besonders die Werte, die zwischen 1 und 5 mg liegen, sich in Stufen von je ½ mg/100 ccm scharf voneinander abheben.

Da die wässerigen violetten Lösungen mehrere Wochen unverändert haltbar sind, läßt sich auf bequeme Weise eine *Vergleichsskala* herstellen, indem in Reagenzgläser von gleicher Glasdicke und gleichem Durchmesser je 10 ccm Harnsäurelösungen gebracht werden, deren Harnsäuregehalt um je ½ mg auf 100 ccm ansteigt. Diese bringt man nach Ausführung der Reaktion in ein Gestell, hinter dem sich ein weißes Blatt Papier befindet, und beobachtet im auffallenden Licht. Durch

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 62, 1110, 1915.
[2]) The Journ. of Biol. Chem. 20, 633, 1915.

Einordnung der zu prüfenden Lösung in diese Vergleichsskala läßt sich die vorhandene Harnsäuremenge am besten erkennen.

Wenn auch die Herstellung der Farbenskala aus zunehmenden Harnsäuremengen an sich überaus einfach ist und die dabei erhaltenen Farbtiefen leicht erkennbar sowie mehrere Wochen haltbar sind, so wurde dennoch versucht, mit künstlichen, durch anorganische Stoffe hervorgerufenen Färbungen eine brauchbare Skala aufzustellen. Dabei erwiesen sich die durch Mischen wässeriger 10proz. Lösungen von *Kobaltnitrat* und *Chromalaun* erzielten Farbtöne den mit Harnsäure erhaltenen als sehr ähnlich. Es entsprachen:

0,55 ccm Co-Lösung + 0,55 ccm Cr-Lösung + 8,9 ccm H_2O der Färbung mit 1,5 mg Harnsäure in 100 ccm.
0,75 ccm Co-Lösung + 0,75 ccm Cr-Lösung + 8,5 ccm H_2O der Färbung mit 2,0 mg Harnsäure in 100 ccm.
0,9 ccm Co-Lösung + 1,0 ccm Cr-Lösung + 8,1 ccm H_2O der Färbung mit 2,5 mg Harnsäure in 100 ccm.

Für die Herstellung stärkerer Vergleichslösungen mußte die jeweilige Chromalaunmenge gegenüber der Kobaltnitratmenge etwas vergrößert werden. Der Vergleich mit den auf diese Weise hergestellten Farblösungen muß im auffallenden Lichte vorgenommen werden.

Die Bestimmung mittels einer Vergleichsskala wird im allgemeinen für die Praxis genügen, da sich mit ihr Unterschiede von je ½ mg Harnsäure in 100 ccm hinreichend genau feststellen lassen. Genauere Bestimmungen werden sich voraussichtlich mit Hilfe eines geeigneten Kolorimeters ausführen lassen.

Um die Brauchbarkeit des Verfahrens für den *Nachweis* und die *Bestimmung* der *Harnsäure* in *Milch* zu prüfen, wurden mehrere Proben Milch untersucht. Dabei wurden in zwei Proben je 1 mg und in vier Proben je 1,5 mg Harnsäure auf 100 ccm Milch gefunden.

Die für die Analyse notwendige Abscheidung der Eiweißstoffe der Milch wurde nach dem Verfahren von *Pfyl* und *Turnau*[1]) ausgeführt, das sich dabei gut bewährt hat.

50 ccm Milch wurden in einem Glaskolben, der mit einem Uhrglas bedeckt war, 20 Minuten lang im kochenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wurde in eine Stöpselflasche umgefüllt, 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff hinzugegeben und 5 bis 10 Minuten gut durchgeschüttelt. Hierauf wurde mit 2 ccm einer 20proz. Essigsäure versetzt und abermals etwa 5 Minuten geschüttelt. Dann wurde zentrifugiert, wobei sich Tetrachlorkohlenstoff, der schwerer ist als das Milchserum, unterhalb des abgeschiedenen Eiweißes absetzte. Von dem völlig klaren Serum („Tetraserum") wurden 10 ccm durch ein gehärtetes trockenes Filter in ein Reagensglas filtriert. Dann wurden mit der Pipette zu der wasserklaren Lösung 0,5 ccm 10proz. Salzsäure gegeben und hierauf zu der in der Regel auch

[1]) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **40**, 245, 1912.

hiernach klar gebliebenen Flüssigkeit ebenfalls mit der Pipette 1 ccm des Reagens hinzugefügt. Diese Mischung wurde bei Zimmertemperatur etwa 10 Minuten stehengelassen. Hierbei schied sich infolge der Phosphorwolframsäureeinwirkung ein flockiger Niederschlag von Eiweißstoffen ab, von dem durch Filtrieren in ein Reagenzglas getrennt wurde. Das völlig klare, meist vollständig farblose Filtrat wurde über der Flamme rasch bis zum beginnenden Sieden erhitzt und dann bei gewöhnlicher Temperatur 2 Stunden stehengelassen. Nach dieser Zeit hatte in der Regel die inzwischen eingetretene Violettfärbung ihre volle Stärke erreicht. Zweckmäßig wurde noch bis zum nächsten Tage gewartet und dann aus der Farbtiefe der völlig klar gebliebenen violetten Lösung durch Vergleich mit einer aus wässerigen Harnsäurelösungen hergestellten Farbenskala der Harnsäuregehalt der Milch festgestellt.

Ferner wurden mehrere Beispiele ausgeführt, bei denen der Milch Harnsäure in Höhe von 1, 1,5 und 2 mg/100 ccm zugesetzt war. Stets konnte die Summe der von Natur aus vorhandenen und der zugesetzten Harnsäure richtig gefunden werden, ein Zeichen, daß im Verlauf des Verfahrens keine Harnsäure verloren gegangen war.

Als Beispiele für die Bestimmung der Harnsäure im *Blute* wurden mehrere Proben von *Hammelblut* und von *Rinderblut* untersucht. Die Hammelblutanalysen ergaben Harnsäuremengen, die zwischen 0,5 und 1 mg/100 ccm lagen, während in einer Probe von Rinderblut 0,5 mg und in zwei anderen Proben etwa 0,75 mg Harnsäure gefunden wurde.

Die Abscheidung der Eiweißstoffe aus dem Blute wurde teils mit Essigsäure, teils unter Zusatz von Formaldehyd oder Natriumacetat durchgeführt. Diejenige mit Essigsäure allein ging auf folgende Weise vor sich:

10 ccm Blutserum wurden in einem 100-ccm-Kölbchen mit 20 ccm kochend heißen Wassers versetzt und dazu tropfenweise mit Hilfe eines Glasstabes 20proz. Essigsäure gegeben, bis die Flüssigkeit gerade sauer reagierte. Zu starkes Ansäuern mußte dabei vermieden werden, da sonst nach der Ausfällung der Eiweißstoffe die Lösung trüb erschien; in der Regel genügten 3 bis 4 Tropfen Essigsäure (Prüfung mit Lackmuspapier). Dann wurde das Kölbchen 20 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad gebracht. Von den dabei abgeschiedenen Eiweißstoffen wurde die noch heiße, völlig klare und farblose Flüssigkeit durch ein kleines trockenes gehärtetes Filter in eine Glasschale filtriert und das Eiweiß zweimal mit je 5 ccm ganz schwach mit Essigsäure angesäuerten Wassers unter Erhitzen auf dem Wasserbade ausgewaschen, damit unter Umständen im Eiweiß verbliebene kleine Mengen von Harnsäure nicht verloren gingen. Diese Waschflüssigkeit wurde ebenfalls in die Glasschale gegeben. Hiernach wurde auf dem Wasserbade bis auf etwa 8 ccm Flüssigkeitsmenge eingedampft. Hatten sich dabei nochmals kleine Mengen Eiweiß ausgeschieden, so wurde abermals filtriert und Glasschale und Filter mit etwa 2 ccm heißen Wassers ausgewaschen, so daß im ganzen ein Filtrat erhalten wurde, das bei Zimmertemperatur 10 ccm betrug. Zu diesen 10 ccm wurden nach der Abkühlung mittels Pipette 0,5 ccm 10proz. Salzsäure und hierauf ebenfalls mit einer Pipette 1 ccm der Reagenzlösung gegeben und hiernach etwa 10 Minuten

bei Zimmertemperatur stehengelassen. Von den inzwischen ausgeschiedenen Eiweißstoffen wurde durch ein kleines Filter in ein Reagenzglas filtriert und dann die völlig klare Flüssigkeit rasch über der Flamme bis zum beginnenden Sieden erhitzt. Hierauf wurde nach zweistündigem Stehen mit Hilfe der Farbenskala die Harnsäuremenge ermittelt.

Auch bei den Blutanalysen blieb die violette Lösung völlig klar und in der Farbstärke 1 bis 2 Tage unverändert. Zuweilen machte sich neben der violetten Färbung eine ganz schwach braune bemerkbar, die jedoch die Beurteilung der Harnsäuremenge nicht störend beeinflußte.

Sowohl den Hammelblutserum- wie den Rinderblutserumproben wurden Mengen von 0,5 bis 2 mg/100 ccm Harnsäure absichtlich zugesetzt. Die hiernach erzielten Analysenergebnisse waren durchgehends befriedigend.

Soweit Stoffe im Blute vorhanden sein sollten, die mit dem Reagens ebenfalls Violettfärbungen hervorrufen (vgl. S. 131), sich aber durch *Ausschüttelung mit Chloroform* beseitigen lassen, verfährt man folgendermaßen:

Man bringt die im Verlaufe der Analyse nach dem Eindampfen und dem Auswaschen erhaltenen 10 ccm Flüssigkeit in einen Scheidetrichter, dazu 20 ccm reines destilliertes Chloroform und schüttelt gut durch. Dann läßt man bis zur völlständigen Trennung längere Zeit stehen, wobei sich in der Regel Eiweißstoffe ausscheiden, die durch Umschütteln in die Chloroformlösung gebracht werden. Hierauf wird die Chloroformschicht abgelassen und die zurückgebliebene wässerige Flüssigkeit durch ein kleines Filter filtriert, wobei stets wieder 10 ccm Flüssigkeit erhalten werden. Erforderlichenfalls kann die Ausschüttelung mit einer kleinen Menge Chloroform wiederholt werden. Die Lösung wird dann, wie oben beschrieben, mit dem Reagens behandelt.

Um die Brauchbarkeit der Chloroformausschüttelung zu erproben, wurden sowohl zu wässerigen Harnsäurelösungen wie auch zu Milch- und Blutproben kleine Mengen Indol und Skatol zugesetzt. Die Beseitigung dieser Stoffe gelang jedesmal vollkommen. Auch konnte festgestellt werden, daß durch die Ausschüttelung mit Chloroform keine Herabminderung der der vorhandenen Harnsäuremenge entsprechenden Violettfärbung herbeigeführt wurde.

Handelt es sich um Verbindungen, die erst durch die Einwirkung der Salzsäure in Stoffe zerlegt werden, die eine Violettfärbung hervorrufen, so muß die Ausschüttelung nach dem Versetzen mit Salzsäure erfolgen. Dies ist z. B. der Fall, wenn mit beträchtlichen Mengen von Indikan (vgl. S. 132) zu rechnen ist.

Zusammenfassung.

1. Es wurde ein Phosphorwolframsäure—Phosphormolybdänsäurereagens von bestimmter Zusammensetzung ermittelt, das sich für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Harnsäure in Milch und Blut verwenden läßt.

2. Die Vorzüge des Verfahrens liegen besonders in der Klarheit und Beständigkeit der mit dem Reagens erhaltenen violetten Färbungen.

3. Mit Hilfe von wässerigen Harnsäurelösungen, die stufenweise um je $1/2$ mg/100 ccm voneinander abweichen, läßt sich eine Vergleichsskala aufstellen, die mehrere Wochen unverändert haltbar ist.

4. Es wurde eine große Reihe von Stoffen auf ihr Verhalten gegenüber dem Reagens untersucht und diejenigen, welche violette Färbungen hervorrufen, nach dem Grad ihrer Nachweisbarkeit in wässeriger Lösung zusammengestellt.

5. Die meisten im Blute vorkommenden Stoffe, die die Harnsäurebestimmung störend beeinflussen könnten, lassen sich durch Ausschütteln mit Chloroform beseitigen.

6. Das neue Reagens wurde an mehreren Bestimmungen von Harnsäure in Milch, Hammel- und Rinderblut erprobt.

Beiträge
zur Frage nach dem Zusammenhang von Kreatin- und Kohlenhydratstoffwechsel [1]).

Von

Alexander Palladin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des Medizinischen Instituts zu Charkow.)

(Eingegangen am 15. Juni 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Es gibt heute schon eine ganze Reihe von Untersuchungen, die auf das Vorhandensein eines bestimmten Zusammenhanges zwischen dem Kreatin- und Kohlenhydratstoffwechsel hindeuten.

Diese Frage rührte als erster *Cathcart* [2]) an, welcher zeigte, daß die bei Menschen durch Hunger hervorgerufene Kreatinausscheidung aufhörte, wenn ihnen in der Nahrung Kohlenhydrate dargeboten wurden („carbohydrate diet, practically nitrogen and fat free"), während die Ernährung mit Fett allein oder mit Eiweißstoffen zusammen auf die Kreatinausscheidung keinen Einfluß hat und dieses auch weiter im Harn sich findet.

Ein gleiches beobachteten *Mendel* und *Rose* [3]) bei ihren Versuchen an Kaninchen, daß nämlich die Kohlenhydrate gegenüber dem Kreatin eine ganz besondere Stellung einnehmen: Fütterung von Kaninchen mit Eiweiß und Fett bei Abwesenheit von Kohlenhydraten ruft Auftreten von Kreatin im Harn hervor, während Anwesenheit von Kohlenhydraten in der Nahrung bei gleichzeitigem Ausschluß von Fett und Eiweiß bei den Kaninchen keine Kreatinausscheidung zur Folge hat, und der Harn wie bei der ge-

---

[1]) Ein Teil der hier gebrachten Untersuchungen wurde zur Zeit des Weltkrieges angestellt; da sie aber nur in einem wenig verbreiteten russischen Journal veröffentlicht wurden und den Biochemikern und Physiologen unbekannt blieben, zudem aber in der Folge durch weitere Untersuchungen ergänzt wurden, hielt ich es für angebracht, sie mit den neuen Untersuchungen zusammen zu veröffentlichen.

[2]) *Cathcart*, Journ. of Physiol. **39**, 311, 1909/10.

[3]) *Mendel* und *Rose*, Journ. of biol. Chem. **10**, 213, 1911.

wöhnlichen gemischten Nahrung nur Kreatinin enthält. Nach diesen Beobachtungen befindet sich die Kreatinausscheidung in inniger Abhängigkeit vom Kohlenhydratstoffwechsel, da sie bei Kohlenhydrathunger auftritt.

Wolf und *Osterberg*[1]) jedoch kamen bei ihren Untersuchungen über den Eiweißstoffwechsel der Hunde bei ungenügendem Gehalt der Nahrung an Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten zu einem anderen Resultat. Sie fanden, daß gleich den Kohlenhydraten auch Eiweiß die Kreatinausscheidung bei Hunden nach dem Hungern zum Stillstand brachte: „Die Verabreichung eines dieser beiden Stoffe (Eiweiß und Kohlenhydrate) in Mengen von wenigstens 60 Proz. unterhalb des Nahrungsbedarfs genügt, um das Auftreten des Kreatins im Harn zu unterdrücken". Fett dagegen zeigt nicht den geringsten Einfluß auf die Ausscheidung von Kreatin bei Hunden während des Hungerns. Nach diesen Angaben *Wolfs* und *Osterbergs* sollte also bei Hunden Kohlenhydrathunger nicht von Kreatinausscheidung begleitet sein.

Wolf[2]) bestreitet überhaupt, daß die Kohlenhydrate eine ausschlaggebende Rolle hinsichtlich des Kreatinstoffwechsels spielen könnten. *Graham* und *Poulton*[3]) wiederholten die Versuche *Cathcarts* und kamen zu dem Schlusse, daß die Resultate seiner Versuche in einem Fehler der Methodik ihre Erklärung fänden, indem er die Gegenwart von Acetessigsäure im Harne beim Kohlenhydrathunger nicht in Betracht zog. Sie fanden, daß Kohlenhydrathunger (Carbohydrate-free diet) bei Menschen keine Kreatinausscheidung erzeugte.

Es besteht also hinsichtlich der Frage der Kreatinausscheidung des Menschen beim Kohlenhydrathunger durchaus noch keine Einstimmigkeit; ebenso ist auch die Ursache der Verschiedenheit der von *Mendel* und *Rose* an Kaninchen erhaltenen Resultate einerseits und der von *Wolf* und *Osterberg* an Hunden erhaltenen andererseits nicht geklärt. Nach den Arbeiten aber von *Krause* und *Cremer*[4]) und *Krause*[5]) über Kreatinausscheidung bei Diabetes mellitus, weiter nach den Arbeiten von *Cathcart*[6]), *Mendel* und *Rose*[7]), *Scheffer*[8]) und *A. Palladin* über Kreatinausscheidung bei Phlorrhizindiabetes, schließlich auch nach den Arbeiten von *A. Palladin* über Kreatinausscheidung bei Glykosurie infolge Kälteeinwirkung[9]) und bei Skorbut[10]) läßt sich kaum mehr daran zweifeln, daß eine Kreatinausscheidung jedesmal auftreten kann, wenn der Tierorganismus aus diesen oder jenen Gründen Mangel an Kohlenhydraten erleidet.

---

[1]) *Wolf* und *Osterberg*, diese Zeitschr. **35**, 329, 1911.
[2]) *Wolf*, Journ. of biol. Chem. **10**, 473, 1911/12.
[3]) *Graham* und *Poulton*, Proc. of the Roy. Soc. **87**, 205, 1914.
[4]) *Krause* und *Cremer*, Journ. of Physiol. **40**, 61, 1910.
[5]) *Krause*, Quart. Journ. Physiol. **3**, 281, 1910.
[6]) *Cathcart*, Journ. of Physiol. **41**, 276, 1910.
[7]) *Mendel* und *Rose*, Journ. of biol. Chem. **10**, 213, 1911.
[8]) *Sheffer*, ebendaselbst **18**, 525, 1914.
[9]) *A. Palladin*, diese Zeitschr. **133**, 89, 1922; **136**, 353, 1923.
[10]) *Derselbe*, ebendaselbst **152**, 228, 1924.

Die folgenden Untersuchungen bringen neues Material, das einerseits für einen Zusammenhang zwischen Kreatin- und Kohlenhydratstoffwechsel überhaupt spricht, andererseits aber die Kreatinausscheidung bei Kohlenhydrathunger klarlegt.

1. Kreatinausscheidung von Hunden bei Kohlenhydrathunger.

Die nachstehenden Versuche über den Einfluß des Kohlenhydrathungers auf die Ausscheidung von Kreatin bei Hunden wurden zu dem Zwecke angestellt, um Klarheit zu verschaffen, ob sich nicht die verschiedenen Resultate der Versuche von *Mendel* und *Rose* und *Wolf* und *Osterberg* durch die Verschiedenheit des Stoffwechselprozesses und insbesondere des Kreatinstoffwechsels bei Kaninchen (Pflanzenfresser) und Hunden (Fleischfresser) erklären lassen, oder ob nicht die Ursachen anderswo liegen.

Die Versuche mit Kohlenhydrathunger wurden so angestellt, daß das Versuchstier zuerst eine gemischte, kreatinfreie Nahrung erhielt, die später durch eine kohlenhydratfreie Nahrung ersetzt wurde. Sowohl die gemischte, als auch die kohlenhydratfreie Nahrung enthielt die gleiche Menge von Kalorien, wobei die Kalorienzahl etwas größer war als die für das betreffende Tier berechnete.

In der ersten Versuchsreihe war sowohl die gemischte, als auch die Fett-Eiweißnahrung derartig zusammengesetzt, daß sie nur wenig Eiweiß enthielt, immerhin aber etwas mehr, als für die Aufrechterhaltung des Stickstoffgleichgewichts nötig war, nämlich 2,0 Eiweiß pro Kilogramm Körpergewicht des Versuchstieres (im Mittel 0,3 g Stickstoff pro Kilogramm). Bei einer solchen Nahrung verloren die Tiere nicht nur nicht im Gewicht, sondern nahmen im Gegenteil mitunter noch zu.

In allen diesen Versuchen erzeugte der Kohlenhydratmangel der Nahrung eine Ausscheidung von Kreatin[1]: Sowie nur die gemischte Nahrung gegen eine isodyname, aber kohlenhydratfreie Nahrung eingetauscht wurde, trat im Urin der Hunde Kreatin auf.

In der Tabelle I sind die Resultate eines dieser Versuche wiedergegeben.

Der Hund bekam bis zum 28. September gemischte Nahrung, bestehend aus 300 ccm Milch, 200 g Hafergrütze, 10 g Fett und 1000 ccm Wasser (ungefähr 1100 Cal). Am 28. September wurde diese Nahrung durch eine kohlenhydratfreie ersetzt, die in 100 ccm Milch, 100 g Käse, 75 g Fett und 900 ccm Wasser bestand (ebenfalls rund 1100 Cal). Am 3. Oktober wurde

---

[1]) In diesen Versuchen wurde der Stickstoffgehalt des Harns nach der Methode von *Folin-Farmer-Gulick* bestimmt, die quantitative Bestimmung des Kreatinins und Kreatins nach der Methode von *Folin* und *Morris* ausgeführt.

der Hund wieder auf die ursprüngliche Nahrung zurückversetzt. Die in der Tabelle I gebrachten Zahlen klären über den Gehalt des Harns an Gesamtstickstoff, Kreatinin und Kreatin auf.

Tabelle I.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
25. IX.	8,12	0,262	—	Normale Nahrung
26. IX.	7,75	0,243	—	Normale Nahrung
27. IX.	7,30	0,235	—	Normale Nahrung
28. IX.	8,89	0,256	—	Kohlenhydratfreie Nahrung
29. IX.	8,45	0,273	0,005	Kohlenhydratfreie Nahrung
30. IX.	7,02	0,232	0,016	Kohlenhydratfreie Nahrung
1. X.	7,93	0,222	0,030	Kohlenhydratfreie Nahrung
2. X.	7,36	0,241	0,023	Kohlenhydratfreie Nahrung
3. X.	6,85	0,228	0,002	Normale Nahrung
4. X.	7,05	0,233		Normale Nahrung

Aus ihr ist ersichtlich, daß schon am zweiten Tage nach dem Übergang zur kohlenhydratfreien Kost im Urin Kreatin auftritt, anfangs in geringen Mengen, später aber mit jedem Tage des Kohlenhydrathungers zunehmend.

Diese Versuche zeigen, daß bei Hunden, im Gegensatz zur Behauptung *Wolfs*, Kohlenhydrathunger von Kreatinausscheidung begleitet ist.

In weiteren Versuchen wurde die Eiweißmenge der kohlenhydratfreien Nahrung vermehrt, und da zeigte es sich nun, daß die Kreatinausscheidung abhängig ist von der mit der Nahrung aufgenommenen Eiweißmenge. Wenn die kohlenhydratfreie (Fett-Eiweiß-) Nahrung Eiweiß im Überschuß enthielt, d. h. mehr, als zur Aufrechterhaltung des Tieres im Stickstoffgleichgewicht nötig war, so trat Kreatinausscheidung entweder überhaupt nicht auf, oder blieb zum mindesten äußerst geringfügig.

Unten (in der Tabelle II) ist ein einschlägiger Versuch angeführt, bei dem kohlenhydratfreie, aber eiweißreiche Nahrung kein Auftreten von Kreatin im Harn zur Folge hatte; erst als dem Tiere überhaupt jede Nahrung entzogen wurde, kam es zur Kreatinausscheidung. Das Resultat dieses Versuchs stimmt vollkommen mit denen von *Wolf* und *Osterberg* überein.

Der 17,5 kg schwere Hund bekam bis zum 12. Oktober gemischte Nahrung (von ungefähr 1100 Cal). Vom 13. Oktober an bestand die Nahrung aus 100 ccm Milch, 200 g Casein, 25 g Fett und 900 g Wasser (gleichfalls rund 1100 Cal). Am 17. Oktober wurde dem Hunde überhaupt jede Nahrung entzogen.

Tabelle II.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
10. X.	5,42	0,220	—	Normale Nahrung
11. X.	6,24	0,227	—	
12. X.	5,64	0,212	—	
13. X.	6,37	0,235	0,001	Kohlenhydratfreie Nahrung
14. X.	6,85	0,197	—	
15. X.	7,30	0,210	—	
16. X.	6,77	0,225	—	
17. X.	7,58	0,188	0,004	Hunger
18. X.	6,35	0,265	0,024	
19. X.	8,27	0,345	0,050	

Wodurch ist das Resultat dieses Versuchs zu erklären? Aller Wahrscheinlichkeit nach damit, daß das überschüssige Eiweiß bei der Abwesenheit von Kohlenhydraten sich in diese umwandelt und dadurch auf einem Umwege das Auftreten von Kreatin im Harn verhindert. Wir wissen ja, daß Eiweiß sich besonders leicht im Hundeorganismus in Kohlenhydrate umwandelt (*Lusk*).

Die Bildung von Kohlenhydraten aus Eiweißstoffen oder Aminosäuren wurde allerdings in beinahe sämtlichen früheren Versuchen bei Hunden nach Entfernung der Pankreasdrüse beobachtet oder nach Injektion von Phlorrhizin; doch ist eine derartige Umwandlung von Eiweiß in Kohlenhydrate auch möglich bei Mangel an Kohlenhydraten in der Nahrung[1]).

In den erwähnten Versuchen bekamen die Hunde während des Kohlenhydrathungers in der Nahrung Eiweiß zusammen mit Fett. Das gleiche Resultat, nämlich Fehlen von Kreatin im Harn, läßt sich auch beim Füttern der Hunde mit Eiweiß allein erreichen, nur muß dessen Menge noch größer sein. Versuche zeigten, daß die Ausscheidung von Kreatin bei Hunden während des Hungerns sich vermindern oder selbst ganz verschwinden kann, wenn man den Hunden zur Nahrung nur Eiweißstoffe, diese aber in reichlichen Mengen gibt. Das Verschwinden des Kreatins aus dem Harn ist in diesem Falle auf die Umwandlung des überschüssigen Eiweißes in Kohlenhydrate zurückzuführen,

[1]) Mit der Bildung von Glykogen aus Eiweiß erklären *Mendel* und *Rose* (l. c. 1911) (auf Grund von Versuchen *Pflügers* und *Junkersdorf*) die Tatsache, daß bei Phlorrhizindiabetes die Kreatinausscheidung verschwinden und wieder erscheinen kann. Versiegt der Vorrat an Glykogen, so empfindet das Tier den Mangel an Kohlenhydraten als Energiequelle und es beginnt die Ausscheidung von Kreatin. Es kommt auf Rechnung von Eiweiß zu einer neuen Glykogenspeicherung und das Kreatin verschwindet wieder aus dem Harn.

infolgedessen der Organismus aufhört, den Mangel an letzteren zu empfinden.

Auf eben diese Weise läßt sich das Resultat der Versuche *Wolfs* und *Osterbergs* erklären. Ihnen gelang, das Kreatin aus dem Harne damit zum Verschwinden zu bringen, indem sie die Hunde mit verhältnismäßig großen Mengen von Eiweiß fütterten, nämlich mit ungefähr 6 g Eiweiß pro Kilogramm Körpergewicht (1,0 bis 1,6 g Stickstoff).

Das gleiche negative Resultat (im Sinne des Auftretens von Kreatin bei Kohlenhydratabwesenheit in der Nahrung) wird erhalten, wenn man Hunde mit Fleisch (in größeren Mengen) füttert, d. h. mit einer Nahrung, die an und für sich schon Kreatin enthält. In diesem Falle wird auch bei gemischter Nahrung (Kohlenhydrate, Eiweiß und Fetten) im Harn der Hunde Kreatin enthalten sein, aber nicht endogenen, sondern ektogenen Ursprunges. Und wenn nun die Nahrung des Hundes nur aus Eiweiß in Form von Fleisch in größerer Menge und aus Fett besteht, so braucht die Kreatinausscheidung sich nicht zu vermehren, da in diesem Falle der Organismus die Möglichkeit hat, seine Vorräte an Kohlenhydraten mittels der reichlich gebotenen Eiweißmengen zu decken und keinen Kohlenhydrathunger verspürt.

Als Beispiel hierfür sei ein einschlägiger Versuch angeführt (Tab. III).

Der 18 kg schwere Hund bekam bis zum 20. November gemischte Nahrung, bestehend aus 600 g Pferdefleisch, das sorgsam von Sehnen und Bindegewebe gereinigt worden, 100 g Haferbrot, 50 g Schwarzbrot, 10 g Fett und 1000 ccm Wasser (Kaloriengehalt ungefähr 1000 Cal); seit 21. November bestand die Nahrung aus 600 g Pferdefleisch, 50 g Fett und 1000 ccm Wasser (Kaloriengehalt beiläufig der gleiche), enthält also keine Kohlenhydrate.

Tabelle III.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
19. XI.	10,37	0,355	0,160	Normales Futter mit Fleisch
20. XI.	9,85	0,372	0,108	
21. XI.	11,56	0,312	0,064	Kohlenhydratfreies Futter mit Fleisch
22. XI.	12,05	0,364	0,156	
23. XI.	10,26	0,290	0,092	
24. XI.	10,97	0,357	0,102	

Bei derartigen Versuchen vermindert sich beim Übergang zur kohlenhydratfreien Nahrung mitunter der Kreatingehalt des Harns[1]).

[1]) Möglicherweise läßt sich diese Erscheinung mit der Beobachtung *Lehmanns* (H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 476, 1908) in Einklang bringen, daß nämlich Kreatin, subkutan eingeführt, mit dem Harn bloß von wohlgenährten Tieren ausgeschieden wird, bei hungernden aber gänzlich verschwindet (nach *Lehmann* wird sein Stickstoff von den Tieren aufgebraucht, d. h. assimiliert).

Aus allen angeführten Versuchen läßt sich also folgern, daß zwischen den Erscheinungen des Kreatinstoffwechsels und dem Kohlenhydrathunger bei Hunden wie bei Kaninchen kein prinzipieller Unterschied besteht. Bei diesen wie bei jenen hat die Abwesenheit von Kohlenhydraten Ausscheidung von Kreatin zur Folge; so wie der Organismus der Hunde oder Kaninchen Bedarf an Kohlenhydraten zu zeigen beginnt, verstärken sich unverzüglich die Prozesse des Eiweißzerfalls (in den Muskeln) unter Bildung von Kreatin, und dieses letztere erscheint dann im Harn. Der Unterschied besteht bloß darin, daß beim Hunde die Fähigkeit, Eiweiß in Kohlenhydrate zu verwandeln, bedeutend stärker ausgeprägt ist, weshalb er den Bedarf an Kohlenhydraten durch ihre Bildung aus dem Nahrungseiweiß leicht decken kann. Darum hängt bei Hunden die Kreatinausscheidung beim Kohlenhydrathunger von der Eiweißmenge ihrer Nahrung ab. Bei geringem Eiweißgehalt, der aber immerhin noch das Minimum überschreitet, das zur Aufrechterhaltung des Stickstoffgleichgewichts des Tieres notwendig ist, hat Kohlenhydratentziehung Ausscheidung von Kreatin zur Folge; bei reichlichem Gehalt der Nahrung an Eiweiß tritt Kreatin im Harn nicht auf.

2. Kreatinausscheidung bei Kohlenhydrathunger weißer Ratten[1]).

Besteht bei Ratten eine ebensolche Abhängigkeit des Kreatinstoffwechsels vom Kohlenhydratstoffwechsel wie bei Hunden und Kaninchen? Schreiten auch bei ihnen jene Prozesse endogenen Eiweißstoffwechsels in den Muskeln über die Grenzen der Norm hinaus, bei welchen Kreatin gebildet wird, sobald sich Mangel an Kohlenhydraten fühlbar macht?

Die unten angeführten Versuche geben auf diese Fragen eine bejahende Antwort.

In der Tabelle IV bringen wir einen Versuch von Kohlenhydratentziehung an einer erwachsenen Ratte (Körpergewicht 184 g), die längere Zeit hindurch mit gemischter, kreatinfreier, aus Brot, Käse und Fett bestehenden Nahrung gefüttert wurde, deren Wärmewert rund 41 Cal betrug. In den ersten 6 Tagen wurde der Harn von je 2 Tagen gesammelt. Für diese Zeit ist, um einen Vergleich mit dem während des Versuchs täglich gesammelten Harn zu ermöglichen, in der Tabelle IV der mittlere Wert für 1 Tag angeführt.

An den beiden ersten in der Tabelle IV verzeichneten Tagen bekam die Ratte gemischte Nahrung; der Harn war kreatinfrei. Vom dritten Tage an wurden die Kohlenhydrate aus der Nahrung fortgelassen und durch Käse und Fett ersetzt, so daß der Kaloriengehalt der gleiche blieb (bei 40 Cal).

---

[1]) Nach gemeinsam mit *A. Risskaltshuk* ausgeführten Versuchen.

Tabelle IV.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an				Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	Ammoniak-N g	
3. V.	0,114	0,0025	—	0,005	7,0 g Brot; 3,0 g Käse; 1,5 g Fett
4. V.	0,104	0,0023	0,0002	0,005	5,0 g Käse; 2,0 g Fett
5. V.	0,130	0,0027	0,0010	0,008	
6. V.	0,146	0,0021	0,0014	0,009	
7. V.	0,100	0,0022	0,0020	0,006	
8. V.	0,176	0,0021	0,0027	0,009	
9. V.	0,125	0,0020	0,0028	0,008	
10. V.	0,133	0,0023	0,0033	0,007	4,0 g Fett
11. V.	0,076	0,0024	0,0016	0,011	7,0 g Brot; 3,0 g Käse; 1,5 g Fett
12. V.	0,097	0,0023	0,0007	0,010	
13. V.	0,092	0,0023	—	0,004	

Die Kohlenhydratentziehung hatte auf den Gesamtstickstoffgehalt des Harns nur geringen Einfluß; die Gesamtausscheidung des Stickstoffs vergrößerte sich nur um ein geringes. Zu Ende der Kohlenhydratentziehung war sie ungefähr die gleiche wie am dritten bis vierten Tage der Entziehung.

Der Ammoniakgehalt des Harns ging beim Übergang zur kohlenhydratfreien Ernährung in die Höhe (besonders am vierten Tage), was durchaus verständlich ist, da infolge der Abwesenheit von Kohlenhydraten die vollständige Verbrennung der Fette erschwert war.

Besonders deutlich zeigte sich der Übergang auf kohlenhydratfreie Kost in dem Auftreten von Kreatin im Harn, das schon am ersten bis zweiten Tage der Kohlenhydratentziehung ausgeschieden wurde, wenngleich auch nur in geringen Mengen.

Später, bei fortdauernder Abwesenheit von Kohlenhydraten in der Nahrung wurde der Kreatingehalt des Harns in dem Maße, als die Kohlenhydratreserven im Körper der Ratte verschwanden, immer größer und größer. Am achten Tage des Kohlenhydrathungers war die Menge des Kreatins im Harn bereits größer als die des Kreatinins.

Am neunten Tage wurden auch die Eiweißstoffe entzogen und erhielt die Ratte mit der Nahrung nur mehr Fett.

Aus diesem Grunde wuchs der Gehalt des Ammoniaks im Harn. Zugleich vermehrte sich auch die Ausscheidung sowohl des Kreatins wie auch des Kreatinins.

Daraufhin bekam die Ratte wiederum Kohlenhydrate, und zwar die gleiche gemischte Nahrung, die sie zu Beginn des Versuchs bekommen hatte.

Schon am ersten Tage fiel die Menge des Kreatins im Harn, und am dritten Tage verschwand es aus ihm vollkommen.

Das gleiche Resultat läßt sich erzielen, wenn die Ratte mit Fleisch gefüttert wird, d. h. mit kreatinhaltiger Nahrung. Nur ist in diesem Falle das ganze Erscheinungsbild nicht so scharf und deutlich. Bei Fleischnahrung (zusammen mit Brot und Fett) wird im Harn exogenes Kreatin ausgeschieden. Wenn man daher aus der Nahrung das Brot entfernt, so äußert sich der Einfluß des Kohlenhydrathungers in einer Vermehrung des Kreatins im Harn, der neuerliche Übergang zu gemischter Nahrung in einer Verminderung des Kreatins, aber nicht in einem Neuerscheinen und Verschwinden von Kreatin, wie dies im ersten Falle statthatte. Ein diesbezüglicher Versuch ist in der Tabelle V gebracht.

Tabelle V.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 2 Tagen an:			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
6. VI. — 7. VI.	0,79	0,0079	0,0048	Brot, Fleisch, Fett
8. VI. — 9. VI.	0,79	0,0122	0,0082	Fleisch u. Fett
10. VI. — 11. VI.	0,82	0,0171	0,0115	Fleisch u. Fett
12. VI. — 13. VI.	0,82	0,0189	0,0056	Fleisch u. Fett
14. VI. — 15. VI.	0,78	0,0076	0,0046	Brot, Fleisch, Fett

In diesem Versuche wurde der Harn alle 2 Tage gesammelt, und die in der Tabelle V aufgezeichneten Zahlen beziehen sich auf den Gehalt der betreffenden Harnbestandteile für je 2 Tage.

Aus den Versuchen mit Kohlenhydratentziehung bei weißen Ratten sehen wir, daß das Fehlen der Kohlenhydrate in der Nahrung eine über die Grenzen des Normalen hinausgehende Verstärkung der Prozesse endogenen und mit der Bildung von Kreatin in Zusammenhang stehenden Eiweißstoffwechsels zur Folge hat und eine verstärkte Kreatinausscheidung im Harn hervorruft. Fehlen die Kohlenhydrate in der Nahrung, so tritt im Harn der Ratte Kreatin auf, wenn den Tieren Kohlenhydrate gegeben werden, so verschwindet das Kreatin wieder.

3. Kreatinausscheidung bei Kohlenhydrathunger von Meerschweinchen.

Unten ist einer der Versuche von Kohlenhydratentziehung bei Meerschweinchen angeführt, welcher zeigt, daß auch bei diesen Tieren ein enger Zusammenhang zwischen dem Kohlenhydrat- und Kreatinstoffwechsel besteht: Wenn die Kohlenhydratzufuhr mit der Nahrung eingestellt wird und der Bedarf an ihnen sich fühlbar macht, geht der normale Kreatinstoffwechsel über seine normalen Grenzen hinaus und es beginnt eine verstärkte Bildung von Kreatin, das im Harn zur Ausscheidung kommt.

In diesem Versuche (Tabelle VI) bekam das Meerschweinchen (ein 511 g schweres Männchen) zuerst normales Futter, bestehend aus 24 g Heu und 21 g Schwarzbrot.

Tabelle VI

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
3. V.	0,0935	0,0041	—	Normal; Heu und Brot
4. V.	0,0875	0,0030	—	
5. V.	0,1153	0,0046	—	
6. V.	0,0847	0,0031	—	
7. V.	0,3520	0,0028	0,0027	Kohlenhydratfreies Futter
8. V.	0,4380	0,0032	0,0042	
9. V.	0,5000	0,0020	0,0073	

Am fünften Tage wurde dieses Futter durch ein isodynames, kohlenhydratfreies ersetzt, das aus 18 g Hühnereiweiß und 0,4 g Fett bestand.

Unmittelbar nach diesem Übergang an kohlenhydratfreier Nahrung begann die Ausscheidung von Kreatin, das bei normaler Nahrung im Harn ganz und gar fehlte. Am zweiten Tage der Kohlenhydratentziehung wurde schon mehr Kreatin ausgeschieden als Kreatinin, dessen Menge gegenüber der normalen Ernährung sich nicht veränderte.

Die vermehrte Ausscheidung an Gesamtstickstoff bei Kohlenhydrathunger ist auf den vermehrten Stickstoffgehalt der Nahrung zurückzuführen.

Beim Kohlenhydrathunger ruft bei den Meerschweinchen ein Überschuß an Nahrungseiweiß keinen Stillstand in der Kreatinausscheidung durch den Harn hervor. Sie gleichen in dieser Hinsicht den Kaninchen.

4. Einfluß des Glycerins auf die Kreatinausscheidung.

Die vorhergehenden Versuche zeigten den engen Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Kreatinstoffwechsel. Sowie der tierische Organismus an Kohlenhydraten Mangel empfindet, so beginnt auch schon die Bildung und Ausscheidung von Kreatin.

Wenn nun ein derartiger Zusammenhang zwischen Kohlenhydraten und Kreatin wirklich besteht, so erscheint es außerordentlich interessant, den Einfluß jener Verbindungen auf die Kreatinausscheidung zu untersuchen, die bei Abwesenheit von Kohlenhydraten in der Nahrung als Ausgangsmaterial in der Bildung von Kohlenhydraten im Körper auftreten, sich selbst in Kohlenhydrate umwandeln und dadurch den Bedarf des Organismus an dieser Energiequelle decken können.

Von diesem Gesichtspunkte aus zog das Glycerin unsere Aufmerksamkeit auf sich, bezüglich dessen in der Literatur sich Angaben finden, denen zufolge es sich in Kohlenhydrate umzuwandeln vermöge.

Külz[1]) konstatierte eine starke Vermehrung (auf 40 bis 200 g) der Zuckermenge im Harn von Diabetikern nach Einnahme von 150 bis 200 g Glycerin. *Cremer*[2]) fand, daß bei Hunden bei Phlorrhizindiabetes auf Fütterung von 90 g Glycerin der Zucker im Harn sich vermehrte (im Mittel um 50 g), was *Höckendorf*[3]) bestätigte. Eine noch stärkere Bildung von Zucker aus Glycerin stellte *Luthje* (1904) in Versuchen an einem Hunde fest, dem die Bauchspeicheldrüse entfernt worden war. Bei solchen Hunden war die Fütterung mit Glycerin stets mit Ausscheidung von größten Zuckermengen im Harn festzustellen, die sich weder aus den Glykogenreserven, noch aus dem Eiweiß herleiten ließen. Überhaupt rief in allen diesen Versuchen die Fütterung mit Glycerin eine derartig starke Zuckerausscheidung hervor, daß man seine Entstehung nur mit einer direkten Umbildung von Glycerin in Zucker zu erklären vermag. *Schmitz*[4]) fand, daß bei der künstlichen Durchblutung einer Leber mit Blut und beigefügtem Glycerin letzteres rasch verschwand. Warscheinlich wandelte sich auch hier das Glycerin in Zucker um, wodurch eben die Verminderung der Glycerinmenge am Ende der künstlichen Ernährung hervorgerufen wurde.

Alle diese Untersuchungen ließen es erwarten, daß das Glycerin auch in jenen Fällen sich in Kohlenhydrate umwandelte, wenn es einem hungernden Tiere verfüttert würde. Darum wurden auch Versuche angestellt, um den Einfluß der Fütterung von Tieren mit Glycerin auf die Ausscheidung von Kreatin beim Hungern zu erforschen.

Die Versuche wurden an Hunden angestellt, die zuerst normal gemischte Nahrung erhielten, bestehend aus Hafergrütze, Schwarzbrot und Fetten. Hierauf wurde das Tier hungern gelassen. Da aber das Fett keinen Einfluß hat auf die Ausscheidung von Kreatin im Sinne einer Verminderung desselben, so wurden die Hunde nicht ganz, sondern nur teilweise hungern gelassen, indem sie täglich 25 g Fett erhielten (ausgenommen Wasser, das ihnen wie gewöhnlich gegeben wurde). Bei einem solchen Hungerregime begann die Ausscheidung von Kreatin im Harn, und wenn sie erst beträchtlicher geworden war, wurde dem Tiere Glycerin gegeben.

Beifolgend seien die Protokolle zweier solcher Versuche wiedergegeben (Tabelle VII und VIII).

Im ersten Falle bekam der Hund an den ersten 3 Tagen gemischte Nahrung; an diesen Tagen fand sich kein Kreatin im Harn. Vom vierten Tage an wurde der Hund einer unvollkommenen Nahrungs-

---

[1]) *Külz*, Beitr. z. Pathol. u. Ther. des Diabetes **2**, 181, 1875.

[2]) *Cremer*, Ergebn. d. Physiol. **1**, 872, 1902; Münch. med. Wochenschr. **944**, 1902.

[3]) *Höckendorf*, diese Zeischr. **28**, 281, 1910.

[4]) *Schmitz*, ebendaselbst **45**, 18, 1912.

Tabelle VII.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an				Futter
	Gesamt-N g	Ammoniak-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
3. IX.	2,083	0,146	0,1053	—	Normale Nahrung
4. IX.	1,984	0,134	0,1187	—	
5. IX.	2,175	0,227	0,1023	—	
6. IX.	1,644	0,211	0,0863	—	25 g Fett
7. IX.	1,846	0,264	0,0908	0,0122	
8. IX.	1,787	0,273	0,0930	0,0316	
9. IX.	2,232	0,370	0,1313	0,0473	
10. IX.	2,077	0,136	0,1049	0,0154	25 g Fett + 200 g Glycerin
11. IX.	1,966	0,108	0,0945	—	25 g „ + 100 g „
12. IX.	1,898	0,163	0,0990	—	25 g „ + 100 g Stärke

entziehung unterworfen und bekam bloß 25 g Fett. Schon am zweiten Hungertage zeigte sich eine geringe Kreatinmenge im Harne. Am siebenten Versuchstage (dem vierten Hungertage) war die Kreatinmenge des Harns schon recht ansehnlich und deshalb bekam das Tier am achten Tage 200 g Glycerin. Die Ausscheidung von Kreatin fiel am selben Tage noch ganz außerordentlich und am neunten Tage, an dem das Tier nochmals 100 g Glycerin bekam, verschwand das Kreatin gänzlich aus dem Harn. Es fehlte auch am zehnten Tage nach Verabreichung von 100 g Stärke. Die Fütterung des Hundes mit Glycerin hatte das Aufhören der Kreatinausscheidung zur Folge.

Tabelle VIII.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatenin-N g	Kreatin-N g	
15. IX.	1,634	0,0893	—	Normal
16. IX.	1,960	0,1008	—	
17. IX.	1,613	0,0945	—	25 g Fett
18. IX.	1,736	0,0893	0,0014	
19. IX.	1,837	0,0789	0,0256	
20. IX.	1,957	0,0930	0,0595	
21. IX.	0,816	0,0837	0,0279	100 g Glycerin + 25 g Fett
22. IX.	1,000	0,0655	—	
23. IX.	1,987	0,1101	—	Normal

Im zweiten Versuch (Tabelle VIII) kam das gleiche zur Beobachtung. Bei normaler Nahrung, bestehend aus 75 g Haferbrot, 75 g Schwarzbrot und 7 g Fett, mit einem Energiewert von ungefähr 520 Cal (bei 8,8 kg Körpergewicht des Hundes), fand sich im Harn bloß Kreatinin (am ersten bis dritten Tage). Beim Übergang auf 25 g Fett erschien Kreatin im Harn und seine Menge erreichte am sechsten Tage 0,0595 g (Stickstoff). Am siebenten Tage bekam das Tier 100 g Glycerin und

ebensoviel auch am achten Tage. Das Resultat war: Am siebenten Tage eine starke Verminderung des Kreatingehalts im Harn und am achten Tage sein vollständiges Verschwinden aus demselben.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß die Fütterung von Hunden mit Glycerin Verschwinden der durch Hunger hervorgerufenen Kreatinausscheidung zur Folge hat. Das Glycerin hatte also auf die Ausscheidung und Bildung des Kreatins einen solchen Einfluß, wie die Kohlenhydrate.

Diese Wirkung des Glycerins läßt sich nur damit erklären, daß es sich in Kohlenhydrate umwandelt. Eine derartige Umwandlung stellt absolut nichts Unwahrscheinliches dar. Der tierische Organismus empfindet in diesem Falle gerade so wie beim Phlorrhizin- oder Pankreasdiabetes Mangel an Kohlenhydraten und wandelt darum das Glycerin in solche um.

Lang[1]) fand, daß das Glycerin auf die durch Hungern hervorgerufene Acetonkörperausscheidung ebenso einwirkt, wie die Kohlenhydrate. Die Acidose vermindert sich beim Hunger stark, wenn man dem Tiere eine geringe Menge von Kohlenhydraten verabreicht. Fast gleich stark vermindert sich die Ausscheidung der Acetonkörper bei der Verabreichung von Glycerin (per os). Der Einfluß des Glycerins auf die Acetonurie, ebenso wie auf die Kreatinurie läßt sich mit der Umwandlung des Glycerins in Zucker erklären; in beiden Fällen fehlten dem tierischen Organismus die Kohlenhydrate.

5. Einfluß der Milchsäure auf die Kreatinausscheidung.

Eine weitere Verbindung, für welche der Übergang in Kohlenhydrate gezeigt werden konnte, ist die Milchsäure. Deshalb wurden auch mit ihr ebensolche Versuche angestellt, wie mit Glycerin.

Der erste Hinweis über die Möglichkeit einer Zuckerbildung aus Milchsäure findet sich in der Arbeit von *Neuberg* und *Langstein*[2]). *Embden* und *Salomon*[3]) stellten die Umwandlung von Milchsäure in Glucose bei Hunden mit Pankreasdiabetes fest: Sie fanden, daß die Zuckermenge des Harns pankreasloser Hunde nach Fütterung mit Milchsäure in die Höhe ging (von rund 10 g auf ungefähr 50 g). *Mendel* und *Lusk*[4]) fanden, daß auch beim Phlorrhizindiabetes der Zuckergehalt des Harns bei Hunden nach der Einführung von Milchsäure sich vermehrte. *Parnas* und *Baer*[5]) (1912) wiederholten diese Versuche von *Mendel* und *Lusk* und fanden, daß die Milchsäure sich (im Körper von Kaninchen beim Phlorrhizindiabetes) in Glykose umwandelte. Weiter stellten sie fest, daß überlebende Leber

---

[1]) *Lang*, diese Zeitschr. **9**, 456, 1915.
[2]) *Neuberg* und *Langstein*, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1903, S. 514.
[3]) *Embden* und *Salomon*, Hofmeisters Beiträge **6**, 63, 1906.
[4]) *Mendel* und *Lusk*, Amer. Journ. of Physiol. **16**, 129, 1906.
[5]) *Parnas* und *Baer*, diese Zeitschr. **41**, 386, 1919.

von Schildkröten bei künstlicher Ernährung mit defibriniertem und mit Sauerstoff gesättigtem Blute Milchsäure in Glykogen umwandelte. *Kocher*[1]) fand, daß die Milchsäure gleich den Kohlenhydraten eine gewisse Schutzwirkung auf den Eiweißstoffwechsel ausübe. Die Ausscheidung von Stickstoff bei Hunden während des Hungerns vermindert sich fast gleich stark bei ihrer Fütterung mit Traubenzucker (95 und 75 g) und mit Milchsäure (100 und 80 g).

Es ließ sich erwarten, daß die Bildung von Kohlenhydraten aus Milchsäure auch bei normalen Tieren stattfindet, wenn sie hungern gelassen würden, und daß darum die Fütterung mit Milchsäure gleichbedeutend sein müsse mit der von Kohlenhydraten.

In den Tabellen IX und X bringen wir zwei Versuche mit Milchsäure.

Tabelle IX.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
25. VI.	2,153	0,126	0,002	25 g Fett
26. VI.	2,268	0,128	0,049	
27. VI.	2,456	0,130	0,031	
28. VI.	2,035	0,113	0,009	50 g Milchsäure + 25 g Fett
29. VI.	1,864	0,121	0,004	
30. VI.	3,560	0,120	0,012	100 g Eieiweiß + 25 g Fett

Im ersten Versuch (Tabelle IX) bekam der 15 kg schwere Hund bis zum 23. Juni normale gemischte Nahrung und vom 24. Juni an wurde er hungern gelassen. Das Hungern war wie bei dem Versuch mit Glycerin kein vollkommenes: Es wurden bloß das Eiweiß und die Kohlenhydrate aus der Nahrung entzogen und dem Hunde täglich 25 g Fett gegeben.

Der Harn enthielt am 27. Juni bereits 0,08 g Kreatin; daraufhin wurden dem Hunde am 28. Juni früh 50 g Milchsäure per os eingegeben (in Form von milchsauren Natron). Es kam sofort zu einer Verminderung der Kreatinausscheidung und die Stickstoffmenge des Kreatins fiel von 0,031 g auf 0,009 g. Am folgenden Tage bekam der Hund abermals 50 g Milchsäure, worauf die Kreatinausscheidung noch mehr fiel.

Am 30. Juni fand sich im Harn wieder mehr Kreatin, obgleich das Tier 100 g Eiweiß erhalten hatte.

Das Resultat dieses Versuchs besteht darin, daß die Verabreichung von Milchsäure bei dem hungernden Hunde einen sofortigen Abfall in der Kreatinausscheidung zur Folge gehabt hatte.

[1]) *Kocher*, Journ. of biol. Chem. 25, 571, 1916.

Ein gleiches sehen wir bei dem Versuch, dessen Protokoll in der Tabelle X wiedergegeben ist.

Nach dem Übergang zu reiner Fettnahrung trat im Harn des 13 kg schweren Versuchstieres (Hund) Kreatin auf. Am 5. August war der Harn bereits ziemlich reich an ihm, enthielt ungefähr 0,088 g. Daraufhin wurden dem Hunde 50 g Milchsäure gegeben. Die Ausscheidung von Kreatin sank augenblicklich. Nach neuerlicher Verabreichung von Milchsäure wurde der Abfall in der Kreatinausscheidung noch stärker, und am 8. August fanden sich im Harn nur 0,004 g Kreatin, d. h. neunmal weniger als vor der Verfütterung der Milchsäure. Die verabreichte Menge von Milchsäure zeigte sich unzureichend, um die Prozesse des endogenen Eiweißstoffwechsels in die Grenzen des Normalen zurückzuführen und damit ein vollständiges Versiegen der Kreatinausscheidung zu veranlassen.

Tabelle X.

Datum	Gehalt der Harnmenge von 1 Tag an			Futter
	Gesamt-N g	Kreatinin-N g	Kreatin-N g	
3. VIII.	1,678	0,108	—	25 g Fett
4. VIII.	1,729	0,100	0,018	
5. VIII.	1,820	0,115	0,032	
6. VIII.	1,650	0,110	0,020	50 g Milchsäure + 25 g Fett
7. VIII.	1,475	0,095	0,006	
8. VIII.	1,520	0,106	0,004	
9. VIII.	1,315	0,098	—	100 g Stärke + 25 g Fett

Auf diese Weise zeigen uns alle analogen Versuche, daß die Fütterung von Tieren mit Milchsäure ein jähes Absinken der durch Hunger hervorgerufenen Kreatinausscheidung zur Folge hat.

Uns ist die Fähigkeit der Milchsäure, sich in Kohlenhydrate zu verwandeln, bekannt, sobald die Kohlenhydratreserven des Tieres im Körper zur Neige gehen. Deshalb ist auch in diesen Versuchen die Umwandlung der Milchsäure in Zucker anzunehmen und damit ihre Einwirkung auf die Kreatinausscheidung zu erklären.

Diese Versuche sind gleich wie jene der Glycerinfütterung hungernder Hunde ein weiterer Beweis dafür, daß zwischen dem Kohlenhydrat- und Kreatinstoffwechsel ein enger Zusammenhang besteht. Die Ausscheidung von Kreatin kommt bei hungernden Tieren nicht nur bei Fütterung mit Kohlenhydraten selbst zum Stillstand, sondern auch nach Verabreichung solcher Verbindungen, die Ausgangspunkt für die Bildung von Zucker im Tierkörper sein können.

6. Einfluß der Kohlenhydrate auf den Kreatinstoffwechsel in den Muskeln bei Abkühlung[1]).

In einer meiner früheren Arbeiten fand ich bei der Untersuchung[2]) der Ausscheidung von Kreatin und Kreatinin bei Abkühlung (wobei Glykosurie auftritt), daß bei Kaninchen infolge stärkerer Abkühlung die eine beträchtliche Temperaturerniedrigung ihres Körpers nach sich zieht, im Harn Kreatin auftritt. Diese Kreatinausscheidung erreichte nicht immer die gleiche Höhe und war um so geringer, je reichlicher die Nahrung der Tiere gewesen war und je größer besonders ihr Gehalt an resorbierbaren Kohlenhydraten war.

Wenn bei der gewöhnlichen Nahrung des Tieres tags vorher und am Tage des kalten Bades ein geringer Überschuß an Kohlenhydraten (in Form von Traubenzucker) verabreicht worden war, so verursachte die Abkühlung kein Auftreten von Kreatin im Harn.

In einer meiner anderen Arbeiten[3]) zeigte ich, daß die Abkühlung deshalb zur Kreatinurie führe, weil sie zu erhöhter Bildung von Kreatin in den Muskeln Anlaß gibt, das als solches in den Harn übergeht, ohne Zeit zu einer Umwandlung in Kreatinin zu haben; es zeigte sich, daß nach einer mit stärkerem Wärmeverlust verbundenen Abkühlung (von 39 auf 30° C) der Kreatingehalt in den Muskeln im Einklang mit den zum Zwecke der chemischen Wärmeregulierung verstärkten Prozessen ansteigt, 12 Stunden nach der Abkühlung seinen Höhepunkt erreicht und hernach wieder abfällt, um 42 bis 48 Stunden nach dem Bade zur Norm zurückzukehren.

Auf Grund dieser Resultate ließ sich annehmen, daß die durch die Abkühlung hervorgerufene Kreatinurie sich durch die Verabreichung von Kohlenhydraten im Überfluß ganz unterdrücken lassen könnte, indem sie in diesem Falle ganz zur Bildung von Lactacidogen verwendet würden und eine für die betreffende Synthese ausreichende Energie lieferten, um damit das Muskeleiweiß vor dem Zerfall zu bewahren.

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, diese Annahme auf ihre Richtigkeit zu prüfen; ihr Ziel war aufzuklären, ob Kohlenhydrate, im Überfluß dem Tierkörper zugeführt, einen Einfluß haben auf den durch die Abkühlung gestörten Kreatinstoffwechsel in den Muskeln oder nicht.

Die Versuchsanordnung war im allgemeinen die gleiche wie bei den früher angestellten Untersuchungen über den Einfluß der Abkühlung auf den Kreatingehalt in den Muskeln, mit dem Unterschied, daß diesmal außer der gewöhnlichen Nahrung (Hafer und Heu im Überfluß) die Kaninchen einige Stunden vor dem kalten Bade ver-

---

[1]) Nach gemeinsam mit Dr. *A. Kudrjawzewa* ausgeführten Versuchen.
[2]) *A. Palladin*, diese Zeitschr. **136**, 353, 1923.
[3]) *A. Palladin* und *Kudrjawzewa*, diese Zeitschr. **133**, 89, 1922.

schiedene Mengen von Traubenzucker bekamen, der mit Hilfe einer Magensonde per os eingeführt wurde.

Wie früher, so auch jetzt, wurden die Kaninchen in verschiedenen Zeiträumen nach dem kalten Bade getötet (die einen nach 12, andere nach 18 Stunden usw.) und hierauf unverzüglich der Kreatingehalt der Muskeln festgestellt.

Die Versuche zeigten, daß das kalte Bad, das nach der Verabreichung von Glykose gegeben wurde und die Körpertemperatur ebenso stark herabsetzte, viel schwächer auf den Kreatinstoffwechsel in den Muskeln einwirkte, weshalb auch ihr Kreatingehalt nicht eine derartige Höhe erreichte, als dies bei der Abkühlung ohne vorhergegangene Verabreichung von Traubenzucker der Fall war.

Hier die Protokolle von drei derartigen Versuchen.

Versuch vom 2. April.

Kaninchen, 2000 g schwer; Futter, bestehend aus Hafer, Heu und Kleie, in Überfluß. Um 6 Uhr abends Verabreichung von 25 g Traubenzucker per os. Um 9 Uhr abends kaltes Bad von 11,5°; Dauer 11 Minuten. Die Temperatur des Kaninchens vor dem Bade 39°, nach dem Bade 30°. Am nächsten Tage 3 Uhr nachmittags, d. h. also 18 Stunden nach dem Bade, wurde das Kaninchen getötet und die Muskeln sofort auf Kreatin untersucht. Gefunden wurden 0,545 Proz. Kreatin.

Versuch vom 4. Mai.

Kaninchen, 2200 g schwer; um 9 Uhr abends Einführung von 20 g Traubenzucker per os. Am nächsten Tage 10 Uhr früh Einführung von 20 g Glykose per os, um 5 Uhr nachmittags Einführung von 20 g Traubenzucker subkutan[1]). Um 10 Uhr abends kaltes Bad von 8° C; Dauer 18 Minuten. Die Temperatur des Kaninchens vor dem Bade = 39° C, nach dem Bade 30° C; am folgenden Tage 2 Uhr nachmittags, das sind 16 Stunden nach dem Bade, wird das Kaninchen getötet. In den Muskeln wurden 0,551 Proz. Kreatin gefunden.

Versuch vom 17. Mai.

Kaninchen, 1780 g schwer. Um 12 Uhr Einführung von 20 g Traubenzucker per os. Um 10 Uhr abends kaltes Bad; seine Temperatur war 10,5°, seine Dauer 20 Minuten. Die Temperatur des Kaninchens vor dem Bade 39°, nach dem Bade 30°. Am nächsten Tage um 10 Uhr früh, d. h. 12 Stunden nach dem Bade, wird das Kaninchen getötet. In den Muskeln finden sich 0,552 Proz. Kreatin.

Aus diesen Protokollen ist zu sehen, daß die bei diesen Versuchen erzielte Abkühlung nur eine geringe Kreatinbildung in den Muskeln zur Folge hatte: 12 Stunden nach dem Bade fanden sich in ihnen 0,552 Proz. Kreatin, nach 18 Stunden 0,545 Proz. (normal 0,525 Proz.). Wenn den Kaninchen kein Traubenzucker gegeben wurde, so stieg

---

[1]) Am 3. April und 4. Mai fraß das Tier sein gewöhnliches Futter (Hafer und Heu).

der Kreatingehalt in den Muskeln viel höher, erreichte nach 12 Stunden 0,618 bis 0,634 Proz. Kreatin oder nach 18 Stunden 0,605 bis 0,620 Proz.

In Abb. 1 sind die Resultate beider Versuchsreihen zusammengestellt.

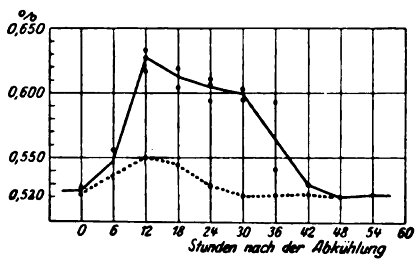


Abb. 1. Die Kurven zeigen den Einfluß der Abkühlung auf den Kreatingehalt der Muskeln von Kaninchen bei *gewöhnlicher* Nahrung (die *obere* Kurve) und bei *Überschuß an Kohlenhydraten* (nach Einführung von Traubenzucker — die *untere* Kurve). In beiden Fällen erhöht sich nach der Abkühlung der Kreatingehalt und fällt dann wieder zur Norm herab, im ersten Falle ist aber der Anstieg der Kurve viel stärker und steiler. 0-Moment der Abkühlung.

An der Kurve ist deutlich zu sehen, daß die Abkühlung auf den Kreatinstoffwechsel in den Muskeln eine schwächere Wirkung dann ausübt, wenn der tierische Organismus einen Überfluß von Kohlenhydraten besitzt, und eine stärkere, wenn ein derartiger Überfluß nicht vorhanden ist. Im ersten Falle (die untere Kurve) erfolgt die Bildung von Kreatin in den Muskeln in geringerem Grade, und die Kurve, welche den Kreatingehalt in den Muskeln zu verschiedenen Zeiten nach der Abkühlung illustriert, erhebt sich nicht besonders hoch und geht allmählich aufwärts; im zweiten Falle kommt es zu einem größeren Zerfall von Muskeleiweiß, der mit einer jähen Verstärkung von Kreatinbildung einhergeht, und die Kurve erhebt sich steil zu bedeutender Höhe und fällt hernach langsam zur Norm herab.

Bei geringem Anstieg des Kreatingehaltes in den Muskeln hat dieses auf dem Wege zu den Nieren Zeit, sich in Kreatinin umzuwandeln, und deshalb tritt bei kohlenhydratreicher Nahrung nach Abkühlung keine Kreatinurie auf.

Bei Kohlenhydratüberfluß erfaßt die Verstärkung der durch die Abkühlung ausgelösten chemischen Prozesse in den Muskeln in erster Linie die Kohlenhydrate und greift nur in geringem Maße in den Kreatinstoffwechsel störend ein; fehlt aber dieser Überfluß, so treten auch die Prozesse des Kreatinstoffwechsels weit über die normalen Grenzen hinaus, was in einem jähen Anstieg des Kreatingehaltes in den Muskeln und in seinem Auftreten im Harn so zum Ausdruck kommt.

Über den autolytischen Abbau organischer Phosphorverbindungen in Geweben.

Beitrag zur Bedeutung der organischen Phosphorverbindungen.

Von

P. György.

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 11. Juni 1925.)

A. Experimenteller Teil.

Die Bestimmung des anorganischen Phosphors in der Blutflüssigkeit gehört heute zu den üblichen Methoden des klinischen Laboratoriums. Die Beurteilung der Floridität oder die Verfolgung der Heilung der rachitischen Stoffwechselstörung setzt — soweit man sich an einen streng objektiven Maßstab halten will — die Kenntnis des Blut-(Serum-) Phosphorwertes voraus. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Werte erfordert die Einhaltung gewisser Kautelen bei der Bestimmung. So muß stets darauf geachtet werden, daß das Serum vom Blutkuchen sofort nach der Gerinnung abgetrennt, oder aber, daß bei Ermittlung des P-Wertes im Gesamtblut, diese ohne Zeitverlust ausgeführt werden soll. Als Grund dieser Maßnahme wird die Gegenwart organischer P-Verbindungen in den Blutkörperchen bezeichnet, die extravasal rasch zerfallen und somit die ursprüngliche Menge der anorganischen Phosphate bei den üblichen Bestimmungen gewaltig erhöhen können. Der flüssige Anteil des Blutes ist frei von solchen organischen P-Verbindungen.

Der Zerfall dieser unbekannten P-haltigen Stoffe wird als ein autolytischer bezeichnet. Der Beweis einer fermentativen Tätigkeit bei dieser Spaltung ist aber — wenigstens für das Blut — bis jetzt noch nicht erbracht worden. Nach *Feigl*, *Zucker-Guttman* u. a. soll Säurehydrolyse in der Hitze den Zerfall begünstigen. Dies deutet auf einen esterartigen Charakter der ursprünglichen Substanz hin. Andererseits konnte *Verfasser* gemeinsam mit *Essinger* den Beweis erbringen, daß bei Zimmertemperatur und bei saurer Reaktion die Spaltung ausbleibt, bei alkalischer Reaktion dagegen beschleunigt zutage tritt. In diesem Verhalten wurde eine fermentative Reaktion vermutet, um so mehr, als gleichzeitig mit diesen Untersuchungen *Sevringhaus* über gleiche Befunde bei der Autolyse der Leber berichtete. Auch hier werden aus

organischen P-Verbindungen Phosphate frei; bei alkalischer mehr als bei saurer Reaktion. Durch Aufkochen des Leberbreis wurde die weitere Spaltung unterbunden. Auch das *Embden*sche Lactacidogen im Muskelgewebe weist bei seiner Spaltung ähnliche Verhältnisse auf.

Die in unserer früheren Arbeit geäußerte Annahme eines fermentativen Prozesses entbehrte aber einer gesicherten Begründung. Diese sollte nun im folgenden erbracht werden, mit Einbeziehung auch noch anderer Gewebe als des Blutes, um so unsere Kenntnisse über diese noch wenig studierten, für die Physio-Pathologie zweifelsohne sehr bedeutungsvollen, organischen Phosphorverbindungen womöglich zu erweitern.

Wir gingen in der Weise vor, daß wir Blut oder frischen Gewebsbrei, hergestellt aus lebenswarmen, vom Schlachthof bezogenen Schweinsorganen, mit oder ohne Zusätze sofort oder nach Ablauf von kürzerer oder längerer Zeit auf ihren anorganischen P-Gehalt nach der Methode von *Bell-Doisy-Briggs* analysiert haben. Die fortlaufende Analyse erlaubt, die durch Spaltung neu entstandene Menge von Phosphaten zahlenmäßig zu fassen. Die in die Tabellen aufgenommenen Werte beziehen sich auf 100 g feuchte Substanz des untersuchten Gewebes, die wir dann auch in Prozenten des Anfangswertes ausgedrückt haben. In einigen Fällen wurde der säurelösliche Phosphor, d. h. der im Trichloressigsäurefiltrat nach Veraschung und nicht nach sofortiger Analyse bestimmte P in die Tabellen mit aufgenommen. Die *Briggs*sche Modifikation der *Bell-Doisy*schen Methode fanden wir sehr zuverlässig. Die Ablesung darf aber nicht vor 1 Stunde nach dem Zusammenbringen der Reagenzien erfolgen, denn die Farbentiefe erreicht erst nach dieser Zeit ihr Maximum. Nach 3 Stunden kann andererseits eine eintretende Reduktion der Molybdänsäure, die sich aber vorher nicht störend bemerkbar macht, die spätere Ablesung vereiteln.

Die der Autolyse unterworfenen Proben kamen meist in den Brutschrank (37°) oder aber über die Zentralheizung (30 bis 33°), um so den autolytischen Prozeß zu beschleunigen.

I.

Die Analysen im Blute (Versuch I bis XI) bestätigten zunächst unsere früheren, gemeinsam mit *Essinger* veröffentlichten Resultate; Hemmung der Spaltung durch Säuren, Förderung durch eine mehr oder minder alkalische Reaktion. Sehr alkalische Reaktion ($p_H > 8,4$) wirkte aber eher wieder leicht hemmend. Bei starker Pufferung, auch mit n/2-Lösungen, konnte in der p_H-Breite von 6,0 bis 7,9 eine Beeinflussung der Spaltung nicht festgestellt werden. In diesen physiologischen Grenzen scheint der Zerfall der organischen P-Verbindungen von der H-Ionenkonzentration unabhängig zu sein.

Von anderen Ionen wirken Ca hemmend, Na und insbesondere K fördernd auf die Spaltung ein. Ähnliche Beobachtungen teilte vor kurzem *Lawaczek* an hämolysiertem Blute mit. Lactate in größerer Konzentration üben einen hemmenden Einfluß aus, während Acetate den Zerfall eher beschleunigen.

Hämolyse scheint die Spaltung ebenfalls stark zu begünstigen. Nach Ablauf einer gewissen Zeit (nach 6 bis 24 Stunden) ist aber in der nicht hämolysierten Blutprobe (ohne jeglichen Zusatz) die Zunahme an anorganischem P oft viel größer, als in den hämolysierten Proben, (z. B. Versuche VI, VIII, IX). Die Hämolyse, d. h. eine sichtbare Membranschädigung, ist für das Eintreten der Phosphatabspaltung demnach nicht erforderlich. Im Gegenteil: in diesem *relativ* hyperosmotischen Milieu scheint die Autolyse begünstigt zu sein. Hier stehen wir in einem gewissen Gegensatz zu *Lawaczek*, der für die P-Abspaltung in der Hämolyse eine anscheinend unerläßliche Bedingung erblickt.

Die Rolle der Hämolyse konnte besonders instruktiv an saponifizierten Blutproben verfolgt werden. Hier tritt gleich nach der Hämolyse eine explosive Zunahme des anorganischen Phosphors ein, die aber in den nicht saponifizierten Blutproben rasch überholt wird. Nach 6, besonders aber nach 24 Stunden bleiben die anorganischen P-Werte in den saponifizierten hinter denen in den unbehandelten Proben weit zurück. Man dürfte mithin von einer Hemmung durch den Saponinzusatz sprechen. Auch hier erfolgt die Phosphatabspaltung am stärksten in den Proben ohne jeglichen weiteren Zusatz. Die Ca-, H- und OH-Ionenwirkung ließ sich auch nach Saponifikation nachweisen[1]).

---

[1]) In diesem Zusammenhange dürfte eine wichtige Beobachtung der physikalischen Zellchemie eine kleine Korrektur erfahren. Bekanntlich lassen sich die roten Blutkörperchen der verschiedenen Tierarten durch Saponin um so leichter hämolysieren, je mehr Phosphate, durch Hypotonie dagegen, je weniger Phosphate sie enthalten. „Da nun nach den Untersuchungen von *Hofmeister* und *Pauli* über den Einfluß der Salze auf die genuinen hydrophilkolloiden Eiweißkörper HPO_4 ungefähr ebenso wirkt wie SO_4 und Tartrat also mit diesen an einem Ende der bekannten Anionenreihe steht, und da nach *Port* auch die Hämolyse durch HPO_4 ungefähr ebenso beeinflußt wird wie durch SO_4, so ist zu vermuten, daß der Antagonismus zwischen der Hypotonie- und der Saponinhämolyse darauf beruht, daß das Plasma der Blutkörperchen gewöhnlich um so konsistenter ist, je höher der HPO_4-Gehalt im Innern, daß dagegen die mit Saponin verbundenen Plasmakolloide gerade umgekehrt um so labiler sind, je höher der HPO_4-Gehalt" (*Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe, 5. Aufl., S. 594). Diese Erwägungen beruhen aber auf der unzutreffenden Voraussetzung, daß die Phosphate im Zellinnern stets in freiem Zustande existieren. An unserem Beispiel der besonders P-reichen Schweineblutkörperchen konnten wir aber den Beweis erbringen, daß dieser P-Reichtum zunächst nicht die elektrodifferenten HPO_4-Ionen, sondern allein die organischen P-Verbindungen betrifft, aus denen erst allmählich beim Stehen extravasal Phosphationen in Freiheit gesetzt werden. Das verschiedene Verhalten der Blutkörperchen von verschiedenen Tierarten gegenüber Hypotonie und Saponin dürfte demnach mit ihrem wechselnden Gehalt an organischem P und nicht an anorganischen Phosphaten in Beziehung stehen.

Besonders beweisend für den fermentativen Mechanismus der P-Abspaltung sind die Versuche VI, VII und VIII. Erhitzen auf 80°, Zusatz von NaF wie auch von Na-Oxalat üben einen stark hemmenden Einfluß auf den Zerfall der organischen P-Verbindungen aus, ähnlich, wie wir es bei fermentativen Prozessen zu sehen gewohnt sind.

Der säurelösliche P überstieg stets schon beim Beginn der Autolyse die Menge des nach 24 Stunden abgespaltenen anorganischen P. Als Muttersubstanz dieser Phosphate dürften demnach organische P-Verbindungen der säurelöslichen Fraktion, aber auch — wenigstens zu einem geringen Teil — Lipoide („Lecithin-P") bezeichnet werden.

II.

Die Verhältnisse, die wir bei der Autolyse des Blutes kennengelernt haben, wiederholen sich mit einer beachtenswerten Einförmigkeit auch bei der Leber. Die Abspaltung des anorganischen Phosphors nimmt mit der Alkalität der den Gewebsbrei umspülenden Flüssigkeit deutlich zu. Von einer Wiederkehr der Hemmung bei besonders erhöhtem p_H — wie beim Blut — haben wir uns bei der Leber nicht überzeugen können. Stärkere Säuregrade hemmen den Zerfall der organischen P-Verbindungen; so insbesonders in Gegenwart von HCl, während sich Milchsäure in dieser Beziehung weniger wirksam erwies (vgl. Versuch XIII). Die Milchsäure dürfte vielleicht durch das überlebende Gewebe in irgendwelcher Weise assimiliert verwertet werden. So üben auch Lactatgemische in einer geringeren Konzentration (n/10) eher einen leicht fördernden Einfluß auf das Freiwerden von anorganischen Phosphaten aus (Versuche XIII, XIV), während dagegen bei stärkeren Konzentrationen eine Hemmung zutage tritt, wie wir sie auch beim Blute gesehen haben. Diese Hemmung kommt bei einem Vergleich mit ähnlich konzentrierten Acetatgemischen besonders deutlich zum Vorschein (Versuch XVI).

Unter den untersuchten Kationen zeichneten sich das K durch eine leicht fördernde, und das Ca durch eine auffallend hemmende Wirkung aus (Versuch XV).

Der schon vor dem Beginn der Autolyse bestimmte hohe anorganische P-Wert schwankt zwischen 41,7 bis 76,3 mg pro 100 g feuchter Substanz, beträgt demnach das 10fache der im Blute präformiert gefundenen Phosphatzahl. Aus diesen Werten auf die Verhältnisse in vivo zu schließen, wäre aber sicherlich verfehlt. Wir dürften eher annehmen, daß die Autolyse in den von uns untersuchten Geweben, so auch in der Leber, nicht erst dann beginnt, wenn wir die in Breiform gebrachten abgewogenen Portionen mit den verschiedenen Suspensionsflüssigkeiten vermischt in den Brutschrank oder über die Heizung

stellen, sondern, daß sie sofort nach dem Tode der Tiere schlagartig einsetzt und schon beim Beginn unserer Versuche durch den Zerfall der organischen P-Verbindungen den Wert der wirklich in vivo präformierten Phosphate vielleicht ins Vielfache steigert. Nach 24 Stunden erhalten wir Phosphatzahlen in der Höhe von 150 bis 200 mg-Proz., die uns deutlich die gewaltige Menge der durch die Autolyse untergegangenen organischen P-Verbindungen vor Augen führen. Im Blute erfolgt die Autolyse, insbesondere bei intakten Blutkörperchen viel langsamer als in der Leber. Dort weist der flüssige Anteil, das Serum, meist gleiche oder sogar etwas größere Mengen an präformierten anorganischem P auf, als die Blutkörperchen. Wenn wir uns nun per analogiam der Annahme bedienen, daß auch in den Leberzellen in vivo die anorganischen Phosphate sich in gleicher Größenordnung bewegen, als in der umspülenden Blutflüssigkeit (vielleicht nur etwas mehr), so werden bei der 24stündigen Autolyse 30- bis 40fache Mengen des präformierten anorganischen Phosphors aus den organischen P-Verbindungen der Zelle frei. Daraus dürfte wohl der Schluß zulässig sein, daß in den Zellen der anorganische Phosphor an Bedeutung hinter den gewaltigen potentiellen P-Reserven dieser zunächst noch unbekannten phosphorhaltigen Substanzen zurücksteht.

III.

Die Verhältnisse bei der Autolyse der Niere stimmen völlig mit denen bei der Leber überein. Auch hier finden wir eine Hemmung bei HCl- und Milchsäurezusatz, eine Förderung dagegen durch OH-Ionen. In der p_H-Breite zwischen 6,0 bis 7,9 bleibt die Spaltung in ihrer Größenordnung ziemlich konstant mit einem kaum ausgeprägten Maximum beim p_H 7,0. Für die physiologisch wichtigen p_H-Werte konnten demnach bei der von uns verwendeten Methodik größere Intensitätsunterschiede im Zerfall der organischen P-Verbindungen nicht wahrgenommen werden. Die hemmende Wirkung des Ca-Kations ließ sich eindeutig nachweisen, ebenso die Hemmung in der Gegenwart starker Konzentrationen an Lactatanionen. Die Förderung durch K kam bei der Niere nicht recht zur Geltung, während sich Na neutral verhielt.

Für die beim Beginn der Versuche bestimmten anorganischen P-Werte gelten die gleichen Einwendungen, die wir im letzten Abschnitt auch für die Leber als berechtigt anerkannt haben. Nach 24stündiger Autolyse erhielten wir Werte, die sich ebenso wie bei der Leber meist zwischen 150 bis 200 mg-Proz. bewegten. Demnach müssen auch die Nierenzellen große potentielle Reservemengen an organischen P-Verbindungen enthalten, aus denen anorganische Phosphate abgespalten werden können.

IV.

Die Autolyse des Gehirns läßt die gleichen Gesetzmäßigkeiten erkennen, die wir im vorstehenden erörtert haben; starke Spaltung bei alkalischer, Hemmung bei saurer Reaktion. In der physiologischen Schwankungsbreite der H-Ionenkonzentration ($p_H = 6{,}0$ bis $7{,}9$) ließ sich kein Optimum nachweisen. Lactatanion in geringer Konzentration fördert, in starker Konzentration hemmt die P-Spaltung. Der wiederholt besprochene Einfluß des Ca-Ions ergänzt noch das Bild. Es ist auffallend, besonders bei dem Parallelismus zum Verhalten der Blutkörperchen, daß im Hirnbrei ohne jeglichen Zusatz die Autolyse zunächst verspätet eintritt, dann aber die in den mit Zusatz versehenen Proben rasch einholt und sogar übersteigt (Versuch XXIII).

Die nach 24stündiger Autolyse durch Spaltung entstandene Menge der Phosphate liegt merklich tiefer, als bei der Autolyse der Leber und der Niere; sie bewegt sich meist um etwa 100 mg-Proz. Der Zerfall erfolgt mit einer geringen Geschwindigkeit, mit einem nur allmählichen Anstieg.

V.

Der Phosphatspaltung im Muskelgewebe unter verschiedenen Bedingungen, so auch im Hinblick auf die Wirkung von Ionen hat die *Embden*sche Schule in den letzten Jahren eine große Anzahl wertvoller Beiträge gewidmet. Wir haben uns demnach auf nur einige orientierende Versuche beschränken können, um so den Zusammenhang mit unseren an anderen Geweben ausgeführten Untersuchungen organischer gestalten zu können. Eine weitere Ergänzung zu unserer Problemstellung glaubten wir weiterhin durch die Wahl des untersuchten Muskelgewebes erreichen zu können, durch Versuche am Herzmuskelgewebe. Die Versuchsresultate der *Embden*schen Schule ermöglichten sodann einen Vergleich im Verhalten der Skelett- bzw. der Herzmuskulatur.

Unsere Ergebnisse stehen mit den Befunden der *Embden*schen Schule im besten Einklang. Wiederum Förderung der Spaltung durch OH-Ionen, wie sie mit Acetatgemischen selbst noch im Bereich $p_H = 6{,}0$ bis $7{,}9$ gut reproduzieren läßt, Hemmung durch H-Ionen. Das Lactatanion in geringer Konzentration scheint die Abspaltung des anorganischen P zu begünstigen (Versuch XXIX), bei stärkerer Konzentration dagegen zu hemmen, wie das uns aus unseren Untersuchungen an anderen Organen schon geläufig ist. Hier erfolgt die Hemmung stärker bei alakalischer, als bei saurer Reaktion, so, daß die bei der Anwendung von Acetatgemischen beobachtete H-Ionen-Optimumreihe eine Umkehr zeigt (Versuch XXX). Eine leichte Förderung durch K und Hemmung durch Ca gilt nur als Wiederholung des schon in den früheren Abschnitten Gesagten.

Mit der Annahme, daß der P-Abspaltung im Stoffwechsel der Zelle und der Gewebe eine erhebliche Bedeutung zukommt, rückt auch der Gedanke nahe, daß different wirkende organische Substanzen, so auch Pharmaka ebenso wie die Ionen (vielleicht auch nur durch Vermittlung von Ionen) den Zerfall der organischen P-Verbindungen erheblich zu beeinflussen vermögen. In der Tat zeigte Zusatz von Digipurat zum Herzmuskelbrei eine früher oder später auftretende, aber stets deutliche Beschleunigung des Spaltungsprozesses. Irgendwelche Schlüsse aus diesen vereinzelten Experimenten sollen nicht gezogen werden, sie dienen nur zur Illustrierung und zur Bestätigung der Beeinflußbarkeit der P-Abspaltung durch differente Pharmaka.

Die nach 24 Stunden autolytisch frei gewordene Menge von anorganischem P weist die gleiche Größenordnung auf (etwa 100 mg-Proz.), wie wir sie bei der Hirnautolyse gefunden haben, und liegt mithin tiefer als bei der Leber- und Nierenautolyse.

VI.

Während die Menge des säurelöslichen P im Blute schon beim Beginn der Autolyse stets höher gelegen gefunden wurde, als die jeweils nach 24stündiger Autolyse entstandene Menge von anorganischem P, und wir so annehmen konnten, daß die Phosphate aus Fraktionen entstehen, die im säurelöslichem P vorher mitbestimmt wurden, sind die Werte für den säurelöslichen P in den Geweben (Leber, Hirn, Niere) meist viel zu niedrig, um eine ähnliche Annahme zu erlauben. Ob in diesem Punkte zwischen Blut einerseits und den Geweben andererseits prinzipielle Unterschiede bestehen, kann zunächst bei der geringen Anzahl der darauf gerichteten Versuche nicht entschieden werden und muß noch weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

B. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Ohne auf die chemische Identität der zum größten Teil noch unbekannten organischen P-Verbindungen in den verschiedenen Geweben Schlüsse ziehen zu dürfen, zeichnet sich die Gruppe dieser Stoffe durch einen weitaus ähnlich verlaufenden Zerfallsmechanismus in den verschiedenen Geweben aus.

Regelmäßig ließ sich nachweisen, daß die Entstehung anorganischer Phosphate aus der organischen Muttersubstanz *gefördert* wird durch *OH-, durch geringe Konzentration von Lactationen, wie auch durch K*, *gehemmt* durch *H-, Ca-Ionen, starke Lactatkonzentrationen.* Hyperosmose (vielleicht eine nur relative Hyperosmose) scheint den Zerfall nach anfänglicher Hemmung zu beschleunigen. Beim Herzmuskel wies Digipuratzusatz eine ähnliche Wirkung auf.

Am Beispiel des Blutes ließ es sich zeigen, daß die Abspaltung des anorganischen Phosphors auf einen *fermentativen Prozeß* zurückzuführen ist. Sie wird durch Hitze und Fermentgifte (NaF, Oxalat) deutlich gehemmt. Als Fermente kommen wohl die Gruppen der *Phosphatasen* in Betracht, die in der neueren Zeit von *Neuberg* und seiner Schule, später auch von anderer Seite eine ausgedehnte Bearbeitung gefunden haben (*Neuberg* mit *Tomita*, *Takahashi*, *Noguchi*, *Akamatsu*, wie auch *Forrai*, *Robison* usw.). Wir sind der Meinung, daß während der Autolyse die Phosphatasen ihre dissimilatorische Wirkung entfalten, die wir dann zahlenmäßig in den Phosphatwerten verfolgen können. Die von uns festgestellten Ionenwirkungen usw. sind als *Beeinflussung der Fermente* aufzufassen. Solche Beeinflussungen sind uns aus der Fermentlehre nur allzu reichlich bekannt.

Wie oben schon erwähnt, decken sich unsere Untersuchungen in den meisten Punkten mit den allein aus dem Verhalten des Muskelgewebes gewonnenen Versuchsergebnissen der *Embden*schen Schule. Wenn nun *Embden* in der Phosphatabspaltung eine besonders auffällige Phase des auch physiologisch bedeutungsvollen intrazellulären Phosphatstoffwechsels der Muskelgewebe erblickt, so liegt der Analogieschluß an der Hand unserer Versuchsresultate nur zu nahe, daß wir den gleichen intrazellulären Phosphatstoffwechsel außer in dem Muskel- auch in den anderen Geweben vermuten und diesen für vital wichtig bezeichnen müssen. Schon unsere Analysenwerte lassen klar erkennen, daß solche großen Mengen an labilen organischen Phosphatverbindungen, bei gleichzeitiger Gegenwart von den diese spaltenden Fermenten einen physiologischen Zweck erfüllen müssen (vgl. auch *Neuberg*).

Für diese Auffassung sprechen auch Befunde jüngeren Datums. So konnten *Lange* und *Simon* (unter *Embden*) auch bei Belichtung der Netzhaut eine Phosphorsäureausscheidung sowohl an der isolierten Retina, wie auch am ganzen Froschauge nachweisen, die sie auf die aktive Tätigkeit des Lichtorgans zurückführen. Ausgedehnte Untersuchungen über den Phosphatstoffwechsel des Nervensystems verdanken wir *Winterstein* und *Hecker*, die bei Reizung und somit bei funktioneller Belastung der nervösen Organe ebenfalls eine Phosphatspaltung beobachtet haben. Die Stoffwechselversuche *Heyers* über Erregung, Hypnose u. a. am Gesamtorganismus sprechen gleichfalls für einen Zusammenhang zwischen Nerventätigkeit und Phosphatstoffwechsel.

Nach *Camis* geht die Speicheldrüsentätigkeit mit einem überaus erhöhten Phosphatabfluß in den abführenden Blutgefäßen einher.

Aber auch von einer anderen Seite lassen sich Beziehungen zwischen den phosphorhaltigen Substanzen des Muskelgewebes und denen der anderen Organe anknüpfen. So ist schon seit langem bekannt, daß die Atmung des überlebenden Muskelgewebes durch Phosphate gesteigert werden kann (*Meyerhof*, *Thunberg*); diese Phosphatwirkung wurde mit der gärungsaktivierenden Wirkung der Phosphate in Parallele gesetzt. Bei der Gärung entstehen die von *Harden-Young* studierten komplexen Kohlehydrat-Phosphatverbindungen, denen im Muskel das *Embden*sche Lactacidogen entsprechen soll. *Lange* glückte der Nachweis, daß die Muskelatmung durch K gesteigert und durch Ca gehemmt werden kann, wie das schon früher für das Ca von *Warburg*, *Moro-Klocmann* und dem *Verfasser* und für das K von *Ellinger* an anderen Objekten gezeigt werden konnte. Auch die atmungssteigernde Wirkung des Phosphats beschränkt sich nicht allein

auf das Muskelgewebe, sie läßt sich stets und eindeutig auch an überlebenden Kalbsdarmzellen demonstrieren (*Verfasser*).

Wenn jetzt *Embden* und seine *Schüler* (*Lange* u. a.) zwischen der Beeinflussung der Muskelatmung und dem Lactacidogenabbau bzw. Synthese kausale Beziehungen anzunehmen geneigt sind, so dürfte diese Schlußfolgerung — die übrigens Verfasser schon seit Jahren vertritt — für sämtliche atmende Zellen des Organismus Geltung haben. Hier dürfte auch an die neueren Vorstellungen *Warburgs* und *Meyerhofs* über die Oxydierbarkeit der Fructose in Gegenwart von Phosphaten erinnert werden.

Die Beschränktheit unseres Versuchsmaterials läßt eine weitere Diskussion dieser so überaus komplizierten Frage zunächst nicht zu. Wir bezweckten nur, die zweifellos bestehende Parallele zwischen Atmung und Phosphatstoffwechsel in ihrer Beeinflussung durch Ionen hervorzuheben und diese nicht nur auf den Muskel, sondern auch auf die anderen Gewebe ausgedehnt zu wissen. Daß diese Beziehungen nicht zwangsläufig sind, und daß Atmung und Zellphosphorstoffwechsel getrennt verlaufen können, wobei jeder Vorgang seinen eigenen Gesetzen untersteht, braucht nicht ausdrücklich hervorgehoben zu werden. Andererseits muß auch noch daran erinnert werden, daß Phosphate nicht nur aus lactacidogenähnlichen Verbindungen, sondern auch aus Lipoiden (Lecithin usw.) entstehen können, so vielleicht hauptsächlich im lipoidreichen Nervengewebe. Auch die Nucleinsäuren können als die Muttersubstanz von Phosphaten fungieren.

Aus dem bisher Besprochenen lassen sich gewisse, uns gewichtig erscheinende Schlüsse ziehen.

Wir müssen z. B. in Analogie zu den anderen Geweben annehmen, daß auch die Zellen der Niere während ihrer Tätigkeit aus der reichen Reserve der organischen Phosphorverbindungen Phosphate in Freiheit setzen. Hiermit dürfte auch der alte Streit, ob die Harnphosphate aus dem Blute oder aber aus den Nierenzellen stammen, eine gewisse Entscheidung erfahren. Wir müssen damit rechnen, daß zumindest *ein Teil der Harnphosphate in den Nierenzellen abgespalten wird.* Ob außerdem auch die Blutphosphate direkt ins Lumen der Glomeruli oder Kanälchen gelangen, bleibt noch offen. Wie aber auch das Ammoniak (*Nash-Benedikt*) in der Niere selbst (übrigens nach den neueren Untersuchungen *Warburgs, Meyerhofs, Grafes* auch in allen anderen Organen) entsteht, so werden auch die Phosphate im Innern der Nierenzellen aus den organischen Phosphorverbindungen abgespalten. Das für die Säureausscheidungsverhältnisse im Urin wichtige Verhältnis zwischen Urin-NH_3 und Phosphaten dürfte demnach eine Aufklärung allein durch das Studium des Nierenstoffwechsels — gewissermaßen losgelöst vom Gesamtorganismus — erfahren.

Die Abspaltung von Phosphaten bei der Nerventätigkeit berührt die Pathogenese der Nervenreizung durch Ionen. Sie läßt sich auch für das Tetanieproblem fruchtbringend verwerten.

In ihren Anschauungen über die Pathogenese der Tetanie haben *Freudenberg* und der *Verfasser* schon des öfteren betont, daß die Ca-Ionisation auch vom Phosphation mitbeeinflußt wird. Die parathyreoprive und auch die idiopathische Tetanie ist zu einem erheblichem Teil als eine Phosphattetanie aufzufassen, wobei die Phosphate aus den Geweben herrühren. Wir stehen also einer Gewebsphosphattetanie gegenüber. Diese vornehmlich theoretisch abgeleitete Schlußfolgerung erhält im Hinblick auf das in dieser Arbeit vorgebrachte Material eine gewisse substantiierte Grundlage. Die

Ursache der Tetanie müßte in einer Störung des intrazellulären Phosphorstoffwechsels gesucht werden. Mit dieser Annahme dürfte auch das sogenannte *Trousseau*sche Phänomen (Pfötchenstellung beim Druck auf die Nerven des Sulcus bicipit. int.) bei der vollentwickelten Tetanie in seinem Mechanismus eine weitere Aufklärung erfahren. Aus den Untersuchungen von *Behrendt-Freudenberg* wissen wir, daß die Pfötchenstellung vornehmlich peripher durch eine Reizung der *Langley*schen „receptive substance" bedingt ist. Die Reizung erfolgt durch Zunahme des Quotienten $\frac{K}{Ca}$ in der umgebenden Gewebsflüssigkeit (vgl. auch *Höber*). Eine einseitige Ca-Entionisierung ist ebenso wirksam wie eine einseitige erhöhte K-Zufuhr. Während die Zunahme der K-Ionen bei der leichten Löslichkeit und Dissoziierbarkeit derselben stets mit Änderungen der Gesamtkaliummenge einhergehen wird, so erlauben die Ionisationsverhältnisse des Calciums eine Zu- oder Abnahme der Ca-Ionen ohne Änderung der Gesamtkalkmenge. So auch bei den verschiedenen Tetanieformen. Bei der Auslösung des *Trousseau*schen Phänomens kommt es infolge Nervenreizung durch Druck zu einer Abspaltung von Ca-entionisierenden Phosphationen (womöglich, sogar wahrscheinlich auch von den antagonistischen K-Ionen), die dann bei den schlechten Ca-Pufferungsverhältnissen der tetanischen Gewebsflüssigkeit an ihrer Austrittsstelle, d. h. an der myoneuralen Funktion *die noch zur Kontraktion ausreichende Verschiebung des Quotienten* $\frac{K}{Ca}$ *in die Wege leiten.*

Auch die Anschauungen von *Kraus-Zondek* über die Ionenreizung der autonomen Nerven dürften durch die Berücksichtigung der Ca-Ionisationsverhältnisse eine nutzbringende Erweiterung erfahren. Man müßte nicht, wie noch neuerdings besonders *Dresel*, bei der „Sympathicusreizung" eine quantitative Verschiebung des Gesamtkalkes postulieren. Auch hier müßte die *Einbeziehung des Phosphations* und insbesondere noch *die Berücksichtigung der lokalen Reaktionsverhältnisse* den tatsächlichen Bedingungen viel eher gerecht sein, als die überholte Forderung von einer obligaten Änderung in der Gesamtkalkverteilung, die freilich unter Umständen auch erfolgen kann[1]).

Bei längerem Stehen tritt aus den Blutkörperchen außer Phosphationen auch noch K aus. Ähnliche Beobachtungen wurden am Muskelgewebe auch von der *Embden*schen Schule gemacht. Wenn auch die quantitativen Beziehungen noch nicht sichergestellt sind, so ist es überaus wahrscheinlich, daß die Phosphate und das K aus einer gleichen Substanz entstehen. Das Lactacidogen dürfte demnach als ein K-Hexose-(Di-)Phosphat aufgefaßt werden. Die Identifizierung der in den anderen Geweben enthaltenen organischen P-Verbindungen bleibt weiteren Forschungen vorbehalten. Nach *Lawaczek* scheint die organische P-Verbindung der roten Blutkörper-

---

[1]) Bei einer Sympathicusreizung kann also das Postulat einer experimentell nicht verifizierbaren Ca-Erniedrigung im Blute getrost aufgegeben werden. So haben wir uns von einer Änderung des Serumkalkgehaltes nach Adrenalininjektion nicht überzeugen können. Auch *Dresel* scheint neuerdings eine quantitative Verschiebung des Quotienten $\frac{K}{Ca}$ mehr durch das K als durch den Gesamtkalk bedingt anzusehen, was unseren Überlegungen entsprechen würde.

chen mit dem Lactacidogen nicht identisch zu sein. *Greenwald* gelang es nun in allerjüngster Zeit, diese P-Verbindung in den Blutkörperchen als ein Glycerophosphat rein darzustellen und zu analysieren. Der Umstand, daß die Blutkörperchen kein Hexosephosphat enthalten, könnte zur Erklärung ihrer fehlenden Atmungsfähigkeit dienen. Die Atmung ist an die Gegenwart einer Hexose (Fructose ?) -Komponente gebunden.

Versuch I[1]).

Nr.	Je 1 ccm Blut + 1 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort[1])		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O. . . .	4,2	100	9,5	226	9,7	231	11,3	266	19,8	471
2	n/10 HCl .	4,2	100	7,0	167	7,0	167	9,3	221	16,0	381
3	n/10 NaOH	4,3	100	—	—	8,5	198	13,0	303	19,4	451
4	—	4,2	100	6,1	145	7,0	167	10,5	250	20,8	495

[1]) Säurelöslicher P = 39,0 mg-Proz.

Versuch II.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 15 Min.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O . . .	6,4	100	7,6	119	12,0	187	18,3	286	26,7	417
2	n/10 NaCl .	—	—	6,5[1])	101	9,0[1])	141	18,3	286	33,3	520
3	n/10 $CaCl_2$	—	—	6,6	103	11,8	184	16,0	250	20,0	312
4	n/10 Lactatg. p_H 4,8 .	—	—	7,8	122	12,0	187	18,6	291	26,0	406
5	Dass. p_H 6,8	—	—	8,0	125	12,0	187	20,6	322	27,0	421
6	Dass. p_H 8,8	—	—	7,9	123	12,2	189	19,6	306	25,6	400

[1]) Noch nicht hämolysiert.

Versuch III.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 4 ccm	Wert des anorganischen P					
		sofort		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	6,5	100	14,5	223	24,6	378
2	n/2 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	20,2	311	30,4	468
3	" " 7,0	—	—	21,6	332	30,4	468
4	" " 7,9	—	—	21,6	332	30,0	462
5	n/2 Lactatgem., 6,0	—	—	17,9	276	24,3	374
6	" " 6,9	—	—	17,9	276	21,6	332
7	" " 7,9	—	—	18,5	285	21,9	337

[1]) Eine größere Anzahl von Versuchen, da sie nur zur Kontrolle dienten, wird nicht veröffentlicht.

Versuch IV.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort[1])		nach 15 Min.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O . . .	5,1	100	6,9	135	13,7	268	18,0	353	25,5	500
2	n/20 NaCl .	—	—	6,7	132	11,2	220	17,0	334	29,2	573
3	n/10 KCl .	—	—	5,7	112	9,7	190	16,0	314	33,3	654
4	n/20 KCl .	—	—	6,5	128	12,0	235	16,7	328	29,6	581
5	n/10 $CaCl_2$	—	—	5,3	104	11,1	218	15,8	310	23,2	455
6	n/20 $CaCl_2$	—	—	5,8	114	12,3	241	15,5	304	25,0	490
7	5proz. Rohrzuckerlsg.	—	—	5,7	112	11,0	216	15,8	310	29,6	581

[1]) Säurelöslicher P = 46,3 mg-Proz.

Versuch V.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 15 Min.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O . . .	5,5	100	7,3	133	15,6	284	21,5	392	28,1	511
2	n/20 NaCl .	—	—	6,9	125	12,9	234	20,3	369	33,1	602
3	n/10 KCl .	—	—	5,8	105	10,6	193	17,9	326	34,7	631
4	n/20 KCl .	—	—	6,6	120	12,8	233	20,3	369	32,1	584
5	n/10 $CaCl_2$	—	—	5,8	105	12,9	234	17,2	313	22,4	407
6	n/20 $CaCl_2$	—	—	6,0	109	13,9	253	19,1	348	25,4	462
7	4proz. Rohrzuckerlsg.	—	—	5,7	104	12,3	224	19,1	348	37,3	678

Versuch VI.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 2 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	5,0	100	5,3	106	6,6	132	12,1	242	32,2	644
2	Wasser	—	—	7,5	150	10,0	200	16,9	338	25,1	502
3	1proz. $NaHCO_3$	—	—	5,7	114	7,1	142	12,0	240	28,7	574
4	n/10 Lactatg., p_H 5,9 . . .	—	—	6,3	126	9,2	184	14,7	294	25,8	516
5	Mit $NaHCO_3$ in Subst. auf 1 Proz. versetzt . . .	—	—	5,4	108	7,8	156	13,9	278	28,7	574
6	wie 1 bis 5. 15 Min. auf 80° erhitzt	—	—	4,8	96	5,0	100	5,3	106	6,3	126
7		—	—	5,3	106	5,5	110	6,9	138	7,5	150
8		—	—	5,5	110	5,6	112	6,6	132	7,6	152
9		—	—	6,1	122	6,2	124	7,4	148	9,6	192
10		—	—	5,0	100	5,0	100	5,9	118	5,8	116

Versuch VII.

Nr.		Je 1 ccm Blut + 2 ccm	Wert des anorganischen P: sofort [1] mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	defibriniert	—	6,2	100	7,7	124	—	—	13,9	208
2	defibriniert	H_2O	—	—	8,7	140	12,5	202	16,1	260
3	defibriniert	n/10 HCl	—	—	6,6	106	7,6	123	Niederschlag	—
4	defibriniert	1 proz. $NaHCO_3$	—	—	—	—	12,7	205	19,3	312
5	defibriniert	n/10 Milchsäure	—	—	7,3	118	9,3	150	Niederschlag	—
6	defibriniert	n/10 Lactatg., p_H 7,0	—	—	10,9	176	13,3	214	20,8	336
7	defibriniert	Dasselbe, $p_H > 8,4$	—	—	10,2	165	12,2	197	17,3	279
8	NaF-Zusatz	—	6,2	100	7,7	124	—	—	9,4	152
9	NaF-Zusatz	H_2O	—	—	8,7	140	—	—	10,8	174
10	NaF-Zusatz	n/10 HCl	—	—	6,4	103	—	—	Niederschlag	—
11	NaF-Zusatz	1 proz. $NaHCO_3$	—	—	8,5	137	—	—	11,0	177
12	NaF-Zusatz	n/10 Milchsäure	—	—	7,0	113	8,3	134	10,2	165
13	NaF-Zusatz	n/10 Lactatg., p_H 7,1	—	—	7,7	124	8,8	142	10,8	174
14	NaF-Zusatz	Dasselbe, $p_H > 8,4$	—	—	7,7	124	8,7	140	10,8	174

[1]) Säurelöslicher P = 40,0 mg-Proz.

Versuch VIII.

Nr.		Je 1 ccm Blut + 2 ccm	Wert des anorganischen P: sofort [1] mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 1 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	geschlagen	—	6,0	100	7,9	132	8,8	147	12,9	215	35,8	597
2	geschlagen	H_2O	—	—	9,6	160	10,4	173	14,7	245	25,8	430
3	geschlagen	n/10 Lactatgem., p_H 5,9	—	—	9,4	157	10,7	178	14,3	238	27,9	465
4	geschlagen	n/10 Lactatgem., $p_H > 8,4$	—	—	9,0	150	9,6	160	12,8	213	22,6	377
6	Oxalatblut	—	6,2	100	7,9	132	9,0	150	11,0	183	19,0	317
5	Oxalatblut	H_2O	—	—	9,1	152	9,8	163	—	—	19,0	317
7	Oxalatblut	n/10 Lactatgem., p_H 5,9	—	—	9,0	150	10,4	173	13,0	217	19,5	325
8	Oxalatblut	n/10 Lactatgem., $p_H > 8,4$	—	—	8,8	147	9,1	152	11,8	197	15,9	265

[1]) Säurelöslicher P = 44,25 mg-Proz.

Im experimentellen Teil unserer Arbeit haben wir uns ausschließlich mit Spaltungsvorgängen befaßt. Schon *Lawaczek* gelang es aber, im Blute, *Embden* und seiner Schule auch im Muskel, außer dem dissimilatorischen Abbau einen synthetischen Aufbau unter Ionenwirkung nachzuweisen. *Lawaczek* spricht in diesem Zusammenhang von einer Dynamik der Blut-

Versuch IX.

Nr.	Je 1 ccm Blutkörperchenbrei + 4 ccm	Wert des anorganischen P: sofort mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 1 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	4,5	100	8,1	180	25,6	569	61,0	1356
2	H_2O	—	—	9,4	207	25,0	556	45,8	1018
3	n/100 NaOH	—	—	9,2	204	25,6	569	50,0	1111
4	saponifiziert —	4,5	100	15,1	336	31,7	705	59,8	1328
5	saponifiziert H_2O	—	—	15,6	347	26,2	583	31,1	691
6	saponifiziert n/100 NaOH . .	—	—	15,6	347	28,1	625	34,8	774

Versuch X.

Nr.	Je 1 ccm Blut + 4 ccm	Wert des anorganischen P: sofort mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 1 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	5,6	100	6,2	109	7,8	139	10,8	193	30,3	541
2	H_2O	—	—	—	—	12,4	222	12,6	225	20,6	368
3	n/20 $CaCl_2$ . .	—	—	8,6	154	10,7	191	12,6	225	19,7	352
4[1]	—	5,7	100	10,5	184	11,2	197	15,4	270	23,4	414
5[1]	H_2O	—	—	10,4	182	11,1	195	12,6	221	20,6	362
6[1]	n/20 $CaCl_2$ . .	—	—	8,5	149	10,5	184	11,0	193	19,7	346

[1]) Vorher mit Saponin hämolysiert.

Versuch XI.

Nr.	Je 1 ccm Blutkörperchenbrei + 4 ccm	Wert des anorganischen P: sofort mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 1 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	5,5	100	8,3	152	11,3	206	25,0	455	—	—
2	H_2O	—	—	11,0	200	12,7	231	23,0	419	55,9	1015
3	n/100 NaOH	—	—	11,7	213	13,0	236	23,3	423	55,9	1015
4[1]	—	5,5	100	18,3	333	18,3	333	33,3	605	50,9	925
5[1]	H_2O	—	—	17,0	309	18,6	338	24,1	439	44,1	803
6[1]	n/100 NaOH	—	—	17,0	309	18,3	333	24,3	442	41,6	757

[1]) Vorher mit Saponin hämolysiert.

Versuch XII.

Nr.	Je 1 g Leber + 5 ccm	Wert des anorganischen P: sofort mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 1 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	76,3	100	81,0	106	87,5	115
2	n/25 HCl	—	—	75,4	99	71,0	93
3	n/25 NaOH	—	—	86,6	114	91,6	120
4	2 proz. $NaHCO_3$ . . .	—	—	89,4	117	101,0	132
5	+ 0,2 ccm Chloroform	—	—	76,3	100	83,3	109

Versuch XIII.

Nr.	Je 1 g Leber + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	53,6	100	78,0	145	84,4	157	116,2	217	188,5	352
2	n/20 HCl . . .	—	—	65,0	121	69,1	121	103,0	192	146,9	274
3	n/10 NaOH .	—	—	80,4	150	93,1	174	140,4	262	214,9	401
4	n/20 Milchsäure	—	—	69,9	130	81,1	151	120,6	225	186,4	348
5	n/10 Lactatg., p_H 5,4 . . .	—	—	78,0	145	84,4	154	125,0	233	184,1	344
6	Dass., $p_H > 8,4$	—	—	82,9	155	100,9	187	131,5	245	206,1	384

Versuch XIV.

Nr.	Je 1 g Leber + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	41,7	100	77,2	186	76,5	184	144,6	348
2	n/10 Milchsäure	—	—	40,7	96	70,0	168	94,3	227
3	n/10 Lactatgem., p_H 4,6	—	—	71,3	172	82,2	198	162,5	392
4	„ „ 5,6	—	—	65,4	158	83,3	200	—	—
5	„ „ 7,4	—	—	63,9	154	83,3	200	162,5	392
6	„ „ > 8,4	—	—	73,5	177	83,3	200	146,3	352

Versuch XV.

Nr.	Je 1 g Leber + 4 ccm	Wert des anorganischen P					
		sofort[1]		nach 15 Min.		nach 1 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	58,5	100	60,8	104	78,3	134
2	n/10 NaCl	—	—	60,8	104	80,1	137
3	n/20 NaCl	—	—	60,8	104	72,1	123
4	n/10 KCl	—	—	62,3	106	90,0	154
5	n/20 KCl	—	—	59,3	101	74,7	128
6	n/10 $CaCl_2$	—	—	61,5	105	67,5	115
7	n/20 $CaCl_2$	—	—	60,0	102	68,4	117

[1]) Säurelöslicher P = 117,8 mg-Proz.

phosphate[1]). Es untersteht wohl keinem Zweifel, daß bei wirklich überlebendem Gewebe sich solche synthetische Prozesse mit Abbau abwechseln.

---

[1]) Leider sprechen sowohl *Lawaczek* wie auch *Emdben* anstatt von Phosphaten von Phosphorsäure, die aber — worauf schon *Meyerhof* hinwies — unter den im Organismus obwaltenden Reaktionsverhältnissen nicht existieren kann.

Versuch XVI.

Nr.	Je 1 g Leber + 5 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 1 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	70,0	100	120	171	117	167	166	235
2	n/1 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	121	173	121	173	168	240
3	" " 7,0	—	—	121	173	125	179	168	240
4	" " 7,9	—	—	123	176	132	186	181	259
5	n/1 Lactatgem, 6,0	—	—	102	146	96	137	151	216
6	" " 6,9	—	—	97	139	108	154	151	216
7	" " 7,9	—	—	108	154	108	154	149	213

Versuch XVII.

Nr.	Je 1 g Niere + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	56,2	100	87,7	156	93,4	166	115,6	206	150,0	267
2	n/10 HCl . . .	—	—	75,4	134	77,6	138	83,7	149	104,0	185
3	n/10 NaOH .	—	—	97,9	174	103,5	184	117,0	208	159,2	284
4	n/10 Milchs. .	—	—	67,5	120	76,5	136	92,6	165	99,1	176
5	n/10 Lactatg., p_H 6,0 . . .	—	—	84,4	150	102,4	182	113,6	202	146,0	260

Versuch XVIII.

Nr.	Je 1 g Niere + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort [1])		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O . . .	37,9	100	65,4	172	—	—	85,0	224	116,3	304
2	n/10 NaCl .	—	—	68,2	179	76,7	202	87,5	230	112,5	299
3	n/20 NaCl .	—	—	65,4	172	77,6	204	85,0	224	112,5	299
4	n/10 KCl .	—	—	69,2	182	75,8	200	81,3	214	118,8	312
5	n/20 KCl .	—	—	65,4	172	73,9	195	87,5	230	112,5	299
6	n/10 $CaCl_2$	—	—	65,4	172	73,0	192	80,0	211	96,25	254
7	n/20 $CaCl_2$	—	—	63,5	167	70,1	184	86,3	228	106,25	280

[1]) Säurelöslicher P = 68,2 mg-Proz.

Bei unserer Versuchsanordnung (im Organbrei) gelang uns der Nachweis synthetischer Vorgänge zunächst nicht. Im Gegensatz zu *Lawaczek* haben wir uns auch im Blute (Schweineblut) von einer Anfangssynthese nicht überzeugen können, was möglicherweise auf den Unterschied im Untersuchungsmaterial zu beziehen ist. Erst das gesonderte Studium der synthetischen und der dissimilatorischen Phase des intrazellulären Phosphatstoffwechsels dürfte für das Zelleben weitere Aufschlüsse liefern.

Versuch XIX.

Nr.	Je 1 g Niere + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	36,0	100	85,2	227	110,4	307	156,0	434
3	n/10 NaCl . .	—	—	84,0	224	109,2	304	158,4	440
3	n/20 NaCl . .	—	—	82,8	220	112,8	313	151,2	420
4	n/10 KCl . . .	—	—	—	—	115,2	320	148,8	413
5	n/20 KCl . . .	—	—	90,0	250	106,8	296	158,8	441
6	n/10 $CaCl_2$ . .	—	—	74,4	206	99,6	276	134,4	374
7	n/20 $CaCl_2$ . .	—	—	76,8	213	103,2	287	148,8	413

Versuch XX.

Nr.	Je 1 g Niere + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	58,0	100	101,6	173	119,6	206	181,9	314
2	n/1 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	112,1	193	130,5	225	163,5	282
3	„ „ 7,0	—	—	113,9	196	132,3	228	169,1	292
4	„ „ 7,9	—	—	113,9	196	132,3	228	174,6	301
5	n/1 Lactatgem., 6,0	—	—	101,6	173	110,3	190	143,3	247
6	„ „ 6,1	—	—	91,9	158	101,6	173	141,5	245
7	„ „ 7,9	—	—	94,6	163	106,6	184	134,1	231

Versuch XXI.

Nr.	Je 1 g Niere + 4 ccm	sofort mg-Proz.	sofort Proz. des Anfangswertes	nach 2 Std. mg-Proz.	nach 2 Std. Proz. des Anfangswertes	nach 6 Std. mg-Proz.	nach 6 Std. Proz. des Anfangswertes	nach 24 Std. mg-Proz.	nach 24 Std. Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	42,5	100	82,3	193	88,3	207	—	—
2	n/1 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	88,2	207	98,5	232	122,0	287
3	„ „ 7,0	—	—	97,0	228	101,4	238	142,6	336
4	„ „ 7,9	—	—	98,5	232	100,0	235	136,7	322
5	n/1 Lactatgem., 6,0	—	—	77,9	183	80,9	190	119,1	280
6	„ „ 6,9	—	—	75,0	176	79,4	187	108,8	256
7	„ „ 7,9	—	—	75,0	176	80,9	190	110,3	260

Versuch XXII.

Nr.	Je 1 g Niere + 7 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 1 Std.		nach 4 Std.		nach 6 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	38,4	100	36,0	94	47,2	123	52,3	136
2	n/70 HCl . . .	34,7	100	37,1	106	43,3	125	48,4	139
3	n/70 NaOH .	35,9	100	38,4	107	55,5	155	55,5	155

Versuch XXIII.

Nr.	Je 1 g Hirn + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	40,3	100	45,1	112	85,5	212	104,6	259
2	H_2O	—	—	45,1	112	72,0	179	95,6	237
3	n/40 NaOH	—	—	47,6	118	78,7	195	100,1	248
4	n/40 Milchsäure . . .	—	—	45,1	112	66,4	165	76,5	190
5	n/10 Lactatgem., p_H 6,0	—	—	47,0	117	70,9	176	95,6	237

Versuch XXIV.

Nr.	Je 1 g Hirn + 8 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort [1]		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	—	33,3	100	32,9	99	35,4	106	44,5	134	88,2	265
2	H_2O	—	—	34,5	104	39,7	119	51,9	156	89,6	269
3	n/80 HCl . . .	—	—	34,2	103	37,8	114	50,6	152	70,0	210
4	n/80 NaOH .	—	—	40,3	121	42,1	127	61,0	183	140,0	420
5	n/80 Milchsäure	—	—	36,0	108	49,4	148	54,3	163	77,0	231
6	n/80 Lactatgem., p_H 4,1 . . .	—	—	42,7	128	50,6	152	59,2	178	74,2	225
7	Dasselbe, p_H 6,1	—	—	43,9	132	53,1	160	61,0	183	79,8	240
8	„ $p_H > 8,4$	—	—	39,7	119	50,6	152	54,9	164	74,2	225

[1]) Säurelöslicher P: 50,6 mg-Proz.

Versuch XXV.

Nr.	Je 1 g Hirn + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort [1]		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std. [2]	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	43,0	100	56,2	131	84,5	196	98,8	230
2	n/10 NaCl	—	—	58,5	136	80,4	187	96,7	225
3	n/20 NaCl	—	—	54,6	127	80,4	187	104,9	244
4	n/10 KCl	—	—	49,1	114	81,8	190	99,5	232
5	n/20 KCl	—	—	54,6	127	84,5	196	106,3	248
6	n/10 $CaCl_2$	—	—	43,7	102	74,9	174	92,7	216
7	n/20 $CaCl_2$	—	—	48,4	112	—	—	91,3	212

[1]) Säurelöslicher P = 54,5 mg-Proz. — [2]) Säurelöslicher P = 114,5 mg-Proz.

Versuch XXVI.

Nr.	Je 1 g Hirn + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	52,7	100	52,7	100	75,5	143	120,1	228
2	n/1 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	58,8	111	76,7	146	106,6	202
3	" " 7,0	—	—	58,8	111	76,7	146	104,1	198
4	" " 7,9	—	—	67,4	128	77,9	148	109,0	207
5	n/1 Lactatgem., 6,0	—	—	53,9	104	67,4	128	87,0	165
6	" " 6,9	—	—	56,3	107	68,6	130	82,8	157
7	" " 7,0	—	—	57,6	109	69,8	132	87,0	165

Versuch XXVII.

Nr.	Je 1 g Herzmuskel + 4 ccm	Wert des anorganischen P									
		sofort		nach 30 Min.		nach 2 Std.		nach 6 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O . . .	40,8	100	50,8	124	59,3	145	78,8	193	92,7	228
2	n/20 HCl .	—	—	45,0	110	45,0	110	Niederschlag	—	Niederschlag	—
3	n/20 NaOH	—	—	57,9	142	67,9	166	94,8	232	101,2	248
4	n/10 Lactatgem., p_H 5,6	—	—	50,1	123	57,9	142	77,7	190	90,5	222
5	n/10 NaCl .	—	—	50,1	123	57,9	142	75,6	186	87,3	214
6	n/10 NaCl + 1 prom. Digipurat	—	—	54,0	132	65,1	160	75,6	186	88,4	216
7	n/10 $CaCl_2$	—	—	47,2	116	56,5	138	70,3	172	82,0	201

Versuch XXVIII.

Nr.	Je 1 g Herzmuskel + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 1 Std.		nach 2 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	n/10 NaCl	59,3	100	63,8	108	68,3	115	94,4	159
2	n/40 NaCl	—	—	59,8	101	69,8	118	100,5	170
3	n/10 KCl	—	—	60,0	101	70,5	119	111,5	188
4	n/40 KCl	—	—	62,3	104	72,0	121	118,9	200
5	n/10 $CaCl_2$.	—	—	62,3	104	64,5	109	100,5	170
6	n/40 $CaCl_2$.	—	—	60,0	101	63,8	108	94,4	159
7	n/10 NaCl + 1 prom. Digipurat	—	—	62,3	104	65,3	110	107,9	182

Versuch XXIX.

Nr.	Je 1 g Herzmuskel + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 1 Std.		nach 5 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	49,0	100	61,7	126	66,8	136	74,5	152
2	n/10 Lactatgem., p_H 7,2	—	—	59,8	122	71,5	146	94,1	192
3	„ „ 6,7	—	—	61,7	126	69,6	142	92,1	188
4	n/10 NaCl	—	—	56,9	116	65,7	134	71,5	146
5	n/10 NaCl + 1 prom. Digipurat	—	—	58,8	120	65,7	134	84,3	172

Versuch XXX.

Nr.	Je 1 g Herzmuskel + 4 ccm	Wert des anorganischen P							
		sofort		nach 2 Std.		nach 7 Std.		nach 24 Std.	
		mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes	mg-Proz.	Proz. des Anfangswertes
1	H_2O	62,5	100	77,1	123	82,5	132	102,4	163
2	n/1 Acetatgem., p_H 6,0	—	—	84,5	135	105,1	168	109,1	175
3	„ „ 7,0	—	—	93,1	149	102,4	163	122,4	196
4	„ „ 7,9	—	—	93,1	149	107,7	172	129,0	206
5	n/1 Lactatgem., 6,0	—	—	77,1	123	—	—	99,8	160
6	„ „ 6,0	—	—	82,5	132	91,8	147	93,1	149
7	„ „ 7,9	—	—	89,1	142	91,8	147	93,1	149

C. Zusammenfassung.

1. Die extravasal aus den Blutkörperchen ausgelaugten Phosphate verdanken ihre Entstehung der fermentativen Spaltung der in den Blutkörperchen in reichlicher Menge vorhandenen organischen P-Verbindungen [Glycerophosphate (*Greenwald*)]. Der Abbau wird durch Phosphatasen bewirkt. Erhitzen der Blutproben auf 80°, Zusatz von Fermentgiften wie von NaFl, auch von Na-Oxalat hemmt die Phosphatspaltung.

2. Hämolyse begünstigt zunächst den Abbau. Dieser findet aber auch in nicht hämolysierten Blutproben statt. Bei einer längeren Versuchsdauer ist die Menge der in Freiheit gesetzten Phosphate hier sogar größer als in den hämolysierten Kontrollen.

3. Auch Saponin hemmt nach anfänglicher Förderung den Zerfall der organischen P-Verbindung.

4. Bei stärkeren Säuregraden bleibt die Spaltung aus, auch höhere Alkaleszenz ($p_H > 8,4$) wirkt ungünstig auf den Vorgang ein. K, Lactate in geringerer Konzentration befördern, Ca, Lactate in stärkerer Konzentration verzögern den Abbau.

5. Im Gewebsbrei von Leber, Niere, Gehirn, Herzmuskel ließ sich die gleiche Ionenwirkung auf die während der Autolyse erfolgte Abspaltung von freien Phosphaten nachweisen.

6. Im Hinblick auf die Forschungsergebnisse der *Embden*schen Schule und auf andere neuere Literaturangaben wird die physiopathologische Bedeutung dieser onnizellulären organischen Phosphorverbindungen ausführlich besprochen.

7. Die bei der Nervenreizung in Freiheit gesetzten Phosphate dürften für die Ca-Ionisation oft von ausschlaggebender Bedeutung sein. Für das sogenannte *Trousseau*sche Phänomen wird in diesem Sinne eine neue Erklärung gegeben.

8. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß die Harnphosphate zum größten Teile in den Nierenzellen infolge Zerfalls organischer P-Verbindungen lokal entstehen.

Literatur.

Behrendt-Freudenberg, Klin. Wochenschr. 1924. — *Bell-Doisy*, Journ. of biol. Chem. **44**, 1920. — *Briggs*, ebendaselbst **53**, 1922. — *Camis*, zitiert nach *Ronas* Bericht **28**, 1924. — *Dresel*, Klin. Wochenschr. 1924, 1925. — *Embden-Lange*, ebendaselbst 1924, hier auch weitere Literatur. — *Essinger-György*, diese Zeitschr. **149**, 1924. — *Feigl*, ebendaselbst **102**, 1920. — *Forrai*, ebendaselbst **145**, 1924. — *Grafe*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925. — *Greenwald*, Jorn. of biol. Chem. **62**, 1925. — *Harden-Young*, diese Zeitschr. **32**, 1911. — *Heyer-Grobe*, Schw. med. Wochenschr. **53**, 1923. — *Lawaczek*, diese Zeitschr. **145**, 1924. — *Meyerhof*, ebendaselbst **150**, 1924; Klin. Wochenschrift 1924. — *Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 1918. — *Noguchi*, ebendaselbst **143**, 1923. — *Robison*, Bioch. Journ. **16**, 1922; **17**, 1923. — *Sevringhaus*, Journ. of biol. Chem. **57**, 1923. — *Tomita* (unter *Neuberg*), diese Zeitschr. **131**, 1922. — *Warburg*, ebendaselbst **146**, **152**, 1924. — *Winterstein-Hecker*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **128**, **129**, 1923. — *S. G. Zondek*, Klin. Wochenschr. 1925.

Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

III. Mitteilung[1]):

Der Einfluß einiger Chinin- und Harnstoffverbindungen auf die Pankreaslipase.

Von

J. A. Smorodinzew und V. A. Danilow.

(Aus der chemotherapeutischen Abteilung des Tropeninstituts am Komm. d. öff. Ges., Moskau.)

(Eingegangen am 11. Juni 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

A. Literatur.

Die Frage über den Einfluß des Chinins auf die Lipase ist von großem Interesse. Die Arbeiten vieler Forscher wurden dem Studium dieses Problems gewidmet; dennoch kann diese Frage noch nicht als endgültig geklärt angesehen werden.

E. Laqueur[2]) scheint als erster den Einfluß des Chinins auf die Lipase des Magensaftes untersucht zu haben; er fand, daß schon 0,01 proz. Chininchloridlösungen die Verseifung des Eidotterfettes verlangsamen, obgleich dieser Prozeß auch bei 2 proz. Alkaloidgehalt im Medium nicht ganz zum Stillstand kommt. In gleicher Weise wird die Spaltung des Tributyrins durch dieselbe Lipase nach den Untersuchungen von *P. Rona* und *M. Takata*[3]) in Gegenwart 0,00003 proz. Lösungen von Chininsulfat, Chinidin, Optochinchlorid, Eucupin und Vucin im Verhältnis ihres Konzentrations- und Dissoziationsgrades bei p_H 8 im Maximum, gehemmt. Chininchlorid in einer Konzentration von 0,00002 Proz. verlangsamt die spaltende Wirkung der Tributyrase des normalen menschlichen Blutserums[4]), des Pankreassaftes, eines Extrakts aus dem Pankreas des Menschen, sowie

---

[1]) Mitgeteilt in einer Sitzung der chem. Abteilung der Ges. von Freunden der Naturwissenschaften, der Anthropol. u. Ethnogr. am 12. Juni 1924.

[2]) *E. Laqueur*, Arch. f. exper. Pathol. **55**, 249, 1906.

[3]) *P. Rona* und *M. Takata*, diese Zeitschr. **134**, 118, 1922.

[4]) *P. Rona* und *D. Reinicke*, ebendaselbst **118**, 215, 1921.

des Fistelsaftes vom Hunde[1]), ferner die Wirkung der Lipase der Milz[2]), des Darmsaftes[3]) und des Hühnereis[3]). Doch wird bei einem Gehalt von 0,02 Proz. Chininchlorid die Lipase der Erythrocyten[4]), der Leber[5]), Lunge, Niere[6]), der Placenta[7]), des menschlichen Harns[8]), der Haut, des Fettgewebes und der Frauenmilch[9]) nicht inaktiviert. Die Lipase des Serums vom Menschen und vom Hunde ist in bezug auf das Chinin (salz-, milch-, ameisen-, essig- und phosphorsaures) im Vergleich zur Serumlipase der Katze, des Kaninchens, des Meerschweinchens und der Ratte 100- bis 1000 mal empfindlicher[10]).

Die nach *Willstätter* gereinigten Lipasen des Pankreas, der Leber und des Serums verhalten sich dem Chinin gegenüber ebenso wie die ursprünglichen wässerigen Extrakte der Organe[11]), doch wird die Empfindlichkeit der Lipase in bezug auf das Chinin durch die Beimengungen erhöht[12]).

Die Resistenz der Gewebelipasen gegenüber dem Chinin im Gegensatz zur Empfindlichkeit der Serumlipase gab einigen Autoren Veranlassung, den Gedanken auszusprechen, daß diese Reaktion auf Grund des ermittelten Einflusses des Chinins auf die Serumlipase zur Diagnostik der Hepatitis und Nephritis dienen könnte[13]). Nach Ansicht dieser Forscher zirkulieren diese dem Chinin gegenüber resistenten Lipasen bei allen denjenigen Erkrankungen der Leber im Blute, bei denen Gallenbestandteile ins Blut gelangen, sowie bei schweren Erkrankungen des Nierengewebes zum Unterschied von leichter Nephritis. Die Wirkung der Lipase des normalen Serums (3 ccm) und desjenigen von Kranken werde durch 2 mg Chinin völlig aufgehoben, während die gleiche Menge des Alkaloids auf die Nierenlipase ohne Einfluß sei[14]). Bei Nephritis werde der Prozentgehalt der gegen Chinin resistenten Lipase im Harn erhöht[15]). Andere Autoren leugnen aber die diagnostische Bedeutung dieser Reaktion ab, da experimentell verletzte Organe von Hunden (Vergiftung, Röntgenstrahlen, Unterbindung des Gallenganges) die Lipase nicht ins Blut abgeben[16]); andererseits ist eine gegen Chinin resistente Lipase im Serum bei verschiedenen Erkrankungen[17]), z. B. bei Leukämie und bei perniziöser Anämie[18]) aufgefunden worden.

---

1) *P. Rona* und *R. Pavlovitch*, diese Zeitschr. **134**, 108, 1922.
2) *F. Krömeke*, Klin. Wochenschr. **2**, 1604, 1923.
3) *T. Koga*, diese Zeitschr. **141**, 430, 1923.
4) *H. Simon*, Zeitschr. f. exper. Med. **39**, 407, 1924.
5) *P. Rona* und *R. Pavlovitch*, diese Zeitschr. **130**, 225, 1922.
6) *P. Rona* und *H. E. Haas*, ebendaselbst **141**, 222, 1923.
7) *K. Maeda*, ebendaselbst **143**, 347, 1924.
8) *E. Bloch*, Klin. Wochenschr. **2**, 1318, 1923.
9) *H. Beumer*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **38**, 593, 1924.
10) *P. Rona* und *D. Reinicke*, diese Zeitschr. **118**, 213, 1921.
11) *P. Rona* und *H. Petow*, ebendaselbst **146**, 144, 1924.
12) *R. Willstätter* und *F. Memmen*, H. S. **138**, 245, 1924.
13) *P. Rona, H. Petow* und *H. Schreiber*, Klin. Wochenschr. **1**, 2366, 1922.
14) *H. Petow* und *H. Schreiber*, Klin. Wochenschr. **2**, 1248, 1923.
15) *E. Bloch*, ebendaselbst **2**, 1318, 1923.
16) *F. Krömeke*, ebendaselbst **2**, 1604, 1923; Arch. f. exper. Pathol. **100**, 77, 1923.
17) *H. Simon*, Deutsch. med. Wochenschr. **49**, 506, 1923.
18) *Derselbe*, Zeitschr. f. exper. Med. **39**, 407, 1924.

B. Experimenteller Teil.

I. Methodik der Untersuchung.

Da wir uns die Aufgabe gestellt hatten, eine systematische Untersuchung des Einflusses verschiedener Chininpräparate auf die fermentativen Funktionen des Organismus auszuführen, so gingen wir nach dem Eiweiß[1]) und dem Kohlehydratferment[2]) zum Fettferment über und stellten es aus dem Pankreas dar.

Das Pankreas eines Ochsen wurde sogleich nach dem Tode des Tieres vom Fett und Bindegewebe abpräpariert und in der Fleischhackmaschine zerkleinert. Darauf wurde die Masse mit etwas Sand im Mörser verrieben und als Aktivator 3 bis 4 g Galle auf je 100 g Drüsensubstanz zugesetzt. Sodann extrahierte man die Mischung in einem dunklen Glase mit der vierfachen Menge wässerigen Glycerins (zwei Gewichtsteile Glycerin auf einen Teil H_2O) bei Gegenwart von Thymol als Antiseptikum. Nach 2 bis 3 Tagen wurde der Extrakt von den Geweberesten abfiltriert. Während einiger Wochen blieb die lipoklastische Kraft des Extrakts unverändert, nahm aber dann ziemlich stark mit steigender Acidität ab.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt. Zu einer in einem konischen, 40 bis 80 ccm fassenden Kolben befindlichen 1proz. wässerigen Lösung von Triacetin, $\begin{matrix} CH_2 \\ | \\ CH \\ | \\ CH_2 \end{matrix} \Big\rangle (OOCCH_3)_3$ wurde hinzugefügt: 8 bis 16 ccm einer Lösung der Versuchssubstanz, 8 bis 16 ccm des Glycerinextraktes des Ferments sowie einige Kubikzentimeter Toluol oder wenige Tropfen Chloroform. Die Reihenfolge der Zusätze sowie die Dauer der Einwirkung des Chinins auf die Lipase ist ohne Bedeutung[3]). Nach einstündigem Verweilen im Thermostaten bei 37 bis 38° wird eine bestimmte Menge der Mischung abpipettiert und mit n/50 KOH-Lösung bei Gegenwart von Phenolphthalein titriert.

II. Vorläufige Versuche.

Zur Neutralisation des Substrats dienten 1 bis 2 Tropfen n/50 KOH. Die Acidität des frisch bereiteten Pankreasextraktes war auch nur gering und ließ sich durch Zusatz von 1,5 bis 3,0 ccm n/50 KOH auf 1 ccm des Extrakts berechnen. Beim Stehen im Thermostaten erhöhte sich die Acidität ein wenig (s. Tabelle I). Chinin allein, ohne Extrakt, veränderte die Acidität der Triacetinlösung nicht.

Die allmählich fortschreitende Spaltung des Triacetins durch die Pankreaslipase ist aus Tabelle II zu ersehen, die zeigt, daß sich durch halbstündlich bis stündlich ausgeführte Titrationen die Wirkung der Lipase auf das Triacetin gut bestimmen läßt.

Uns interessiert vor allem die Frage, welche Reaktionsgleichung der Spaltung des Triacetins durch die Einwirkung der Lipase zugrunde

---

[1]) *J. A. Smorodinzew* und *A. N. Adowa*, diese Zeitschr. **135**, 128, 1923.
[2]) *J. A. Smorodinzew* und *A. S. Novikow*, ebendaselbst **140**, 12, 1923.
[3]) *P. Rona* und *D. Reinicke*, ebendaselbst **118**, 213, 1921.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Temperatur des Versuchs °C	Dauer des Verweilens im Thermostaten Stdn.	Menge des benutzten Extraktes ccm	Menge des zur Neutralisation verbrauchten n/50 KOH ccm
1	30	0	4,0	6,4
2	30	20	4,0	8,2
3	37	0	1,0	2,5
4	37	6	1,0	2,8
5	37	0	1,0	2,85
6	37	8	1,0	3,1

zu legen ist. Nach *Kastle* und *Loevenhart*[1]) kann die Spaltung des Äthylbutyrats durch Organlipase durch das einfache Verhältnis (Regel von *Schütz-Brzissow*):

$$K = \frac{t}{\sqrt{x}} \tag{1}$$

ausgedrückt werden, das von *Knaffle-Lenz*[2]) noch vereinfacht worden ist:

$$K_1 = \frac{x}{t}. \tag{2}$$

Nach *Virtanen*[3]) ist die Spaltung desselben Substrats durch die Milchdrüsenlipase bei beständigem p_H sowohl in alkalischem als in saurem Medium dem Gesetz der Reaktionen erster Ordnung:

$$K_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x} \tag{3}$$

unterworfen.

Wir berechneten die Ergebnisse unserer Versuche (aus Tabelle V) auf Grund dieser drei Gleichungen und ermittelten auch die Konstante der Reaktionen zweiter Ordnung:

$$K_3 = \frac{1}{t_2 - t_1}\left(\frac{1}{a - x_2} - \frac{1}{a - x_1}\right). \tag{4}$$

Tabelle III zeigt, daß der Prozeß im vorliegenden Falle am besten durch die Gleichung für monomolekulare Reaktionen ausgedrückt wird, die wir im folgenden auch nur anwenden werden.

Als Ergänzung wurden zu den Versuchen der Triacetinspaltung durch Lipase bei Gegenwart von Chininchlorid, deren Resultate in

---

[1]) *J. H. Kastle* und *A. S. Loevenhart*, Amer. Chem. Journ. **24**, 491, 1900. *J. A. Smorodinzew*, Die Fermente d. pflanzl. u. tier. Reiches **2**, 203—207, 1920. Moskau (russisch).

[2]) *E. Knaffle-Lenz*, Arch. f. exper. Pathol. **97**, 242, 1923.

[3]) *A. J. Virtanen*, H. S. **137**, 1, 1924.

Tabelle II.

Beobachtungszeit	Kontrolle: H_2O . . . 10,0 H_2O . . . 2,0 Extrakt . 2,0	Triacetin, 1 proz. . . . . . . 10,0 H_2O . . . . 2,0 Extrakt 2,0	
		Acidität	
		allgemein	verstärkt
	ccm	ccm	ccm
9h30′	4,19	4,20	—
10	4,12	6,02	1,9
10 30	4,05	7,08	3,03
11	4,10	8,15	4,05
11 30	4,16	8,77	4,61
12	4,12	9,34	5,22
12 30	4,16	10,03	5,87

Beobachtungszeit	Kontrolle: H_2O . . . 10,0 H_2O . . . 2,0 Extrakt . 2,0	Triacetin, 1 proz. . . . . . . 10,0 H_2O . . . . 2,0 Extrakt 2,0	
		Acidität	
		allgemein	verstärkt
	ccm	ccm	ccm
1h	4,16	10,71	6,55
1 30′	4,2	11,42	7,22
2	4,22	12,05	7,83
2 30	4,3	12,75	8,45
3	4,25	13,24	8,99
3 30	4,31	13,85	9,54
4	4,32	14,28	9,96

Tabelle III.

$k = \frac{x}{t}$	$k_1 = \frac{x}{\sqrt{t}}$	$k_2 = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{a}{a-x}\right)$	$k_3 \cdot 10^{-8} = \frac{1}{t_2 - t_1} \left(\frac{1}{a - x_2} - \frac{1}{a - x_1}\right)$
1,5	2,100	(0,009 57)	539
1,2	2,475	0,007 71	336
1,2	2,829	0,007 78	462
1,2	3,050	0,007 85	479
1,16	3,221	0,007 65	413
1,16	3,402	0,007 76	512

Tabelle IV.

Zeit in Stunden	Triacetin, 1 proz. 10,0 Ch.*) HCl, n/160 2,0 Extrakt . . . . 2,0 Acidität ccm	Triacetin, 1 proz. 10,0 H_2O . . . . . . 2,0 Extrakt . . . . 2,0 Acidität ccm
Anfänglich	2,8	2,1
1h	3,0	2,2
2	2,6	2,3
3	2,6	2,5
4	2,8	2,5
5	2,7	2,5

*) Ch. = Chinin.

Tabellen V bis VIII angeführt sind, Kontrollversuche mit gekochtem Extrakt angestellt, aus denen hervorging, daß bei Gegenwart von Chinin und gekochtem Extrakt das Triacetin nicht hydrolysiert wird (s. Tabelle IV). Aus diesem Grunde wurde die erwähnte Kontrolle nicht wiederholt und alle Versuche nur unter Prüfung der Aciditätsveränderung des Extrakts ausgeführt, d. h. es wurde in den reagierenden Gemischen anstatt Triacetin Wasser angewandt.

Wir untersuchten den Einfluß des Chininchlorids, $C_{20}H_{24}N_2O_2HCl + 2H_2O$, des Chininsulfats, $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2H_2SO_4 + 8H_2O$, eines Doppelsalzes von Chinin und Harnstoff, $C_{20}H_{24}N_2O_2 . CO(NH_2)_2 2HCl + 5H_2O$, sowie den von freiem Harnstoff, $CO(NH_2)_2$, und dessen Chlorid und Nitrat, $CO(NH_2)_2HCl$ und $CO(NH_2)_2HNO_3$, auf den Prozeß der Spaltung des Triacetins.

III. Einfluß des Chininchlorids.

Die Tabellen V bis VIII[1]) und Kurve 1 zeigen, daß das Chininchlorid in Konzentrationen von 0,03 bis 0,23 Proz. den Prozeß der

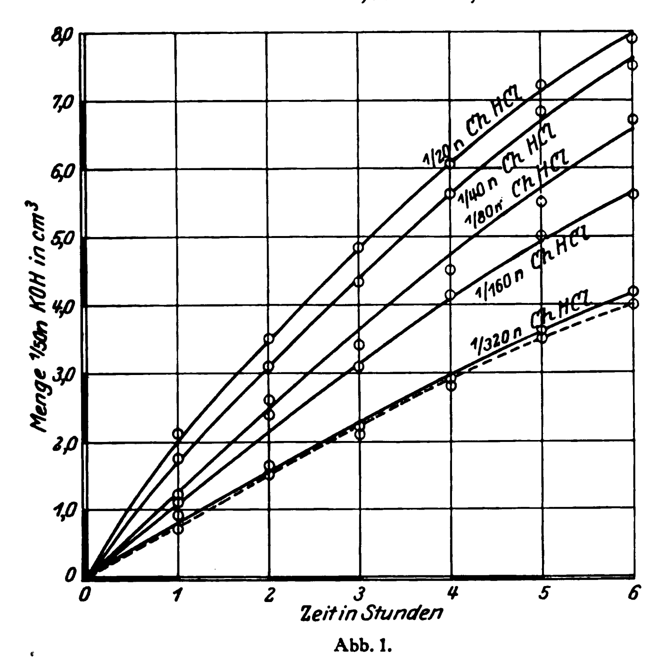


Abb. 1.

Spaltung des Triacetins durch Lipase etwas beschleunigt, bei einer Konzentration von 0,01 Proz. aufhört, auf den Prozeß eine Wirkung auszuüben. Die Spaltung des Triacetins durch Pankreaslipase sowohl

[1]) In den Tabellen sind typische Beispiele aus einer großen Anzahl analoger Versuche angeführt.

Tabelle V.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; Ch. HCl, n/20 . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; Ch. HCl, n/20 . 2,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; Ch. HCl, n/10 . 1,0; H_2O . . . . 1,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; Ch. HCl, n/20 . 1,0; H_2O . . . . . 1,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; H_2O . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2
	ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm	
Anfänglich	11,6	11,6	—	—	9,0	9,1	—	—	4,9	4,8	—	—
1	12,4	14,5	2,1	(0,013 43)	9,5	10,8	1,3	(0,008 29)	5,5	7,0	1,5	(0,009 57)
2	12,5	16,0	3,5	0,011 34	9,8	12,9	3,1	0,010 01	5,6	8,0	2,4	0,007 71
3	12,5	17,4	4,9	0,010 68	10,2	14,8	4,6	0,010 02	5,6	9,2	3,6	0,007 78
4	12,5	18,6	6,1	0,010 08	10,4	16,2	5,8	0,009 56	5,8	10,6	4,8	0,007 85
5	12,6	20,4	7,8	0,010 45	10,2	17,2	7,0	0,009 32	5,8	11,6	5,8	0,007 65
6	12,6	20,9	8,3	0,009 31	10,2	18,2	8,0	0,008 95	6,0	13,0	7,0	0,007 76
			Mittel:	0,010 37			Mittel:	10,009 57			Mittel:	0,007 75

Tabelle VI.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; Ch. HCl, n/40 . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; Ch. HCl, n/40 . 2,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; Ch. HCl, n/80 . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; Ch. HCl, n/80 . 2,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 10,0; H_2O . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2
	ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm	
Anfänglich	8,9	8,9	—	—	7,7	7,8	—	—	4,7	4,7	—	—
1	9,7	11,3	1,6	(0,010 22)	7,8	9,2	1,4	(0,008 93)	5,0	6,3	1,3	(0,008 29)
2	9,9	12,6	2,7	0,008 69	7,9	10,5	2,6	0,008 36	5,3	7,7	2,2	0,007 06
3	10,0	13,5	3,5	0,007 56	8,0	11,4	3,4	0,007 34	5,4	8,5	3,1	0,006 67
4	10,2	14,5	4,3	0,007 01	8,2	12,6	4,4	0,007 17	5,4	9,5	4,1	0,006 67
5	10,2	15,6	5,4	0,007 10	8,2	13,4	5,2	0,006 83	5,6	10,4	4,8	0,006 28
			Mittel:	0,007 59			Mittel:	0,007 43			Mittel:	0,006 67

Tabelle VII.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 Ch. HCl, n/160 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0 Ch. HCl, n/160 2,0 Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 Ch. HCl, n/320 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0 Ch. HCl, n/320 2,0 Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 H_2O . . . . . 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0 H_2O . . . . . 2,0 Extrakt . . . . 2,0 — Acidität		k_2
	ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm	
Anfänglich	6,0	6,1	—	—	5,3	5,3	—	—	4,7	4,7	—	—
1	6,2	7,15	0,95	(0,006 04)	5,3	6,0	0,7	(0,004 44)	4,7	5,4	0,7	(0,004 44)
2	6,2	7,8	1,6	0,005 11	5,4	6,85	1,45	0,004 62	4,7	6,05	1,35	0,004 30
3	6,3	8,35	2,15	0,004 59	5,45	7,35	1,9	0,004 05	4,8	6,7	1,9	0,004 05
4	6,4	9,0	2,6	0,004 18	5,5	8,1	2,6	0,004 18	4,9	7,4	2,5	0,004 02
5	6,4	9,5	3,1	0,004 00	5,45	8,45	3,0	0,003 87	4,9	7,9	3,0	0,003 87
6	6,4	10,4	4,1	0,004 45	5,5	9,4	3,9	0,004 22	5,0	9,0	4,0	0,004 33
			Mittel:	0,004 46			Mittel:	0,004 19			Mittel:	0,004 05

Tabelle VIII.

Zum Versuch dienende Konzentration des Salzes	Gehalt des Chininchlorids im wirkenden Gemisch		Proz.-Gehalt des freien Chinins im Gemisch	Wirkung
	nach dem Volumen ccm	in Gewichtsprozenten	Proz.	
n/20	2,0	0,2571	0,2314	beschleunigt
n/20	1,0	0,1285	0,1157	"
n/40	2,0	0,1285	0,1157	"
n/80	2,0	0,0642	0,0578	"
n/160	2,0	0,0321	0,0289	"
n/320	2,0	0,0160	0,0145	ist wirkungslos

bei Gegenwart von Chinin als auch ohne dieses verläuft nach der Gleichung monomolekularer Reaktionen: $k_2 = \frac{1}{t} \, ln\left(\frac{a}{a - x}\right)$.

IV. Einfluß des Chininsulfats.

Aus den Tabellen IX bis X ersieht man, daß Chininsulfat in Konzentrationen von 0,026 bis 0,01 Proz. die Wirkung der Lipase etwas beschleunigt, bei 0,007 Proz. auf das Ferment keine Wirkung mehr ausübt. Bei Gegenwart von Chininsulfat wird die Geschwindigkeit der Reaktion auch durch eine Gleichung erster Ordnung ausgedrückt.

V. Einfluß der Doppelverbindung von Chinin und Harnstoff.

Die Tabellen XI bis XIV und Kurve 2 zeigen, daß in Gegenwart der Doppelverbindung von Chininchlorid und Harnstoff bei einem Gehalt von 0,6 Proz. im Reaktionsgemenge der Spaltungsvorgang

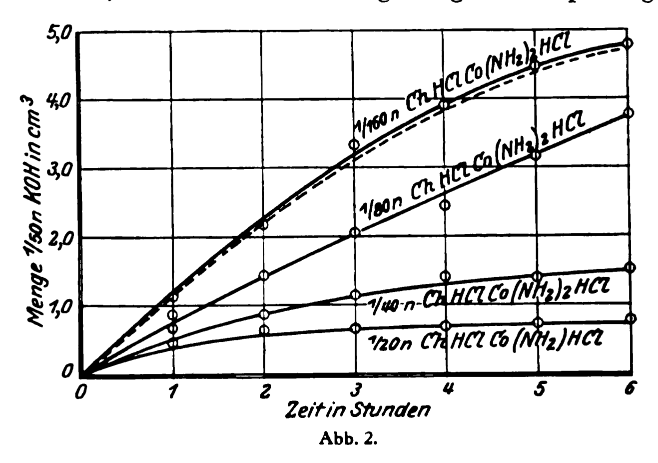


Abb. 2.

völlig zum Stillstand kommt, in einer Konzentration von 0,4 bis 0,16 Proz. verlangsamt wird und daß bei 0,08 Proz. das Doppelsalz auf den enzymatischen Prozeß keinen Einfluß mehr ausübt.

VI. Einfluß des Harnstoffs und seiner Salze.

Die Tabellen XV bis XXI und Kurve 3 zeigen, daß freier Harnstoff in Konzentrationen von 0,75 bis 0,37 Proz. auf die Lipase keine Wirkung ausübt, und daß dessen Salze, das Chlorid in einer Konzentration von 0,07 bis 0,017 Proz. und das Nitrat bei 0,08 bis 0,02 Proz. den Prozeß verzögern. Völlige Wirkungslosigkeit tritt ein, wenn der Gehalt der Salze 0,009 bzw. 0,01 Proz. beträgt.

Der Tabelle XV gemäß entspricht der Prozentgehalt des im Gemisch wirksamen Harnstoffs für je 2,0 ccm einer n/20 $CO(NH_2)_2$-Lösung 0,075 Proz. und für je 1,0 ccm derselben Lösung 0,0375 Proz.

Tabelle IX.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . . 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/310 2,0; Extrakt . . . . 1,0 (ccm)	Triacetin, 1 proz. 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/310 2,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . . 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/310 1,0; H_2O . . . . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 (ccm)	Triacetin, 1 proz. 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/310 1,0; H_2O . . . . . 1,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2
Anfänglich	3,0	2,8	—	—	2,4	2,5	—	—
1	2,95	4,0	1,05	(0,013 46)	2,4	3,35	0,95	(0,012 16)
2	3,2	5,4	2,2	0,014 35	2,75	4,6	1,85	0,012 01
3	3,25	6,4	3,15	0,013 90	3,0	5,4	2,4	0,010 47
4	3,3	7,3	4,0	0,013 42	2,9	6,0	3,1	0,010 26
5	3,6	8,0	4,4	0,011 89	3,25	6,6	3,35	0,008 98
6	3,65	8,2	4,55	0,010 27	3,2	7,05	3,85	0,008 59
			Mittel:	0,012 76			Mittel:	0,010 04

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . . 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/620 1,0; H_2O . . . . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 (ccm)	Triacetin, 1 proz. 5,0; $Ch._2H_2SO_4$, n/620 1,0; H_2O . . . . . . 1,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . . 5,0; H_2O . . . . . . 2,0; Extrakt . . . . . 1,0 (ccm)	Triacetin, 1 proz. 5,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2
Anfänglich	2,10	2,25	—	—	2,1	2,05	—	—
1	2,1	2,9	0,8	(0,010 22)	2,0	2,85	0,85	(0,010 87)
2	2,4	3,8	1,4	0,009 00	2,3	3,8	1,4	0,009 00
3	2,5	4,6	2,1	0,009 12	2,4	4,55	2,15	0,009 34
4	2,6	5,2	2,6	0,008 54	2,5	5,0	2,5	0,008 19
5	2,7	5,8	3,1	0,008 20	2,6	5,6	3,0	0,007 93
6	2,7	6,2	3,5	0,007 77	2,6	6,1	3,5	0,007 77
			Mittel:	0,008 52			Mittel:	0,008 52

Tabelle X.

Zum Versuch dienende Konzentration des Salzes	Gehalt des Chininsulfats im wirkenden Gemisch — nach dem Volumen ccm	in Gew.-Proz.	Proz.-Gehalt des freien Chinins im Gemisch Proz.	Wirkung
n/310	2,0	0,030 08	0,026 13	beschleunigt
n/310	1,0	0,015 04	0,013 07	"
n/620	1,0	0,007 5	0,006 5	ist wirkungslos

Tabelle XI.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 2,0; Extrakt . . . 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 2,0; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 1,5; H_2O . . . 0,5; Extrakt . . . 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 1,5; H_2O . . . . . . 0,5; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 5,0; H_2O . . . . 2,0; Extrakt . . . 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0; H_2O . . . . . . 2,0; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2*)
	ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm	
Anfänglich	9,5	9,6	—	—	7,3	7,4	—	—	2,6	2,6	—	—
1	9,6	10,1	0,5	—	7,7	8,2	0,5	—	2,7	3,3	0,6	(0,007 64)
2	9,6	10,2	0,6	—	7,8	8,55	0,75	—	2,75	3,8	1,05	0,006 73
3	9,65	10,3	0,65	—	7,9	9,0	1,1	—	2,8	4,4	1,6	0,006 89
4	9,6	10,25	0,65	—	7,8	9,0	1,2	—	2,9	5,0	2,1	0,006 84
5	9,55	10,2	0,65	—	8,0	9,05	1,05	—	2,85	5,4	2,55	0,006 69
6	9,55	10,4	0,85	—	7,9	9,1	1,2	—	2,9	5,8	2,9	0,006 37
7	9,6	10,3	0,7	—	7,9	9,2	1,3	—	2,8	6,9	3,4	0,006 46
											Mittel:	0,006 66

*) Überall $k = 0{,}4343\ k$.

Tabelle XII.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 1,0; Extrakt . . . 1,0	Triacatin, 1 proz. 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/20 . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/40 . . . 1,0; Extrakt . . . 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0; Ch. HClCO(NH$_2$)$_2$; HCl, n/40 . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . 5,0; H_2O . . . . 1,0; Extrakt . . . 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0; H_2O . . . . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 — Acidität		k_2
	ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm		ccm	allgemein ccm	verstärkt ccm	
Anfänglich	5,8	6,0	—	—	4,15	4,25	—	—	2,2	2,2	—	—
1	6,0	6,6	0,6	(0,008 14)	4,25	5,0	0,75	(0,009 57)	2,25	3,0	0,75	(0,009 57)
2	6,05	7,1	1,05	0,006 73	4,3	5,7	1,4	0,009 02	2,3	3,6	1,3	0,008 36
3	6,0	7,5	1,5	0,006 45	4,2	6,45	2,25	0,009 79	2,15	4,3	2,15	0,009 34
4	6,05	8,0	1,95	0,006 34	4,25	6,8	2,55	0,008 37	2,25	5,1	2,85	0,009 39
5	6,1	8,4	2,3	0,006 00	4,3	7,6	3,3	0,008 76	2,2	5,6	3,4	0,009 04
6	6,1	8,65	2,55	0,005 58	4,35	8,05	3,7	0,008 24	2,3	6,2	3,9	0,008 71
			Mittel:	0,006 22			Mittel:	0,008 83			Mittel:	0,008 97

Tabelle XIII.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . 5,0; Ch. HCl $(NH_2)_2CO$; HCl, n/80 . . . . . 1,0; Extrakt . . . . . . 1,0 — ccm	Triacetin, 1 proz. . . . . 5,0; Ch. HClCO $(NH_2)_2$ HCl, n/80 . . . . 1,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . . 5,0; H_2O . . . . . . 1,0; Extrakt . . . . . 1,0 — ccm	Triacetin, 1 proz. . . . . 5,0; H_2O . . . . 1,0; Extrakt . . . . 1,0 — Acidität allgemein ccm	Acidität verstärkt ccm	k_2
Anfänglich	2,8	2,8	—	—	2,0	2,0	—	—
1	2,8	3,7	0,9	(0,011 52)	2,0	2,9	0,9	(0,011 52)
2	3,2	4,6	1,4	0,009 02	2,2	3,4	1,2	0,007 71
3	3,5	5,2	1,7	0,007 34	2,3	4,1	1,8	0,007 78
4	3,2	5,5	2,3	0,007 51	2,6	5,0	2,4	0,007 85
5	3,1	5,9	2,8	0,007 35	2,6	5,5	2,9	0,007 65
			Mittel:	0,007 81			Mittel:	0,007 75

Tabelle XIV.

Zum Versuch dienende Konzentration des Doppelsalzes	Gehalt des im Gemisch wirkenden Doppelsalzes		Proz.-Gehalt im Gemisch		Wirkung
	nach dem Volumen ccm	in Gewichtsprozenten	des freien Chinins Proz.	des Harnstoffchlorids Proz.	
n/20	2,0	0,5712	0,406	0,1206	gehemmt
n/20	1,5	0,4284	0,3037	0,0904	verzögert
n/20	1,0	0,3264	0,2314	0,0689	"
n/40	1,0	0,1632	0,1157	0,0344	"
n/80	1,0	0,0816	0,0578	0,0172	ist wirkunglos

Tabelle XV.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0 $CO(NH_2)_2$, n/20 2,0 Extrakt 1,0	Triacetin, 1 proz. . . 5,0 $CO(NH_2)_2$, n/20 . . 2,0 Extrakt 1,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0 $CO(NH_2)_2$, n/20 1,0 H_2O . . . . . 1,0 Extrakt 1,0	Triacetin, 1 proz. . . 5,0 $CO(NH_2)_2$, n/20 . 1,0 H_2O . . . . 1,0 Extrakt 1,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 5,0 H_2O . . . . . 2,0 Extrakt 1,0	Triacetin, 1 proz. 5,0 H_2O . . . . . . 2,0 Extrakt 1,0		k_2
		Acidität				Acidität				Acidität		
		allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt	
	ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm	
Anfänglich	—	2,8	—	—	—	2,8	—	—	—	2,8	—	—
1	3,1	3,8	0,7	(0,008 93)	3,05	3,75	0,7	(0,008 93)	2,85	3,7	0,85	(0,010 87)
2	3,4	4,95	1,55	0,010 01	3,3	4,85	1,55	0,010 01	3,15	4,85	1,8	0,010 35
3	3,4	5,7	2,3	0,010 02	3,3	5,7	2,4	0,010 44	3,25	5,8	2,4	0,010 44
4	3,5	6,65	3,15	0,010 43	3,4	6,6	3,2	0,010 60	3,3	6,5	3,2	0,010 60
5	3,3	7,0	3,7	0,009 88	3,3	7,1	3,8	0,010 17	3,2	6,9	3,7	0,009 88
6	3,3	8,05	4,75	0,010 76	3,4	8,2	4,8	0,010 88	3,2	8,1	4,7	0,010 63
			Mittel:	0,010 22			Mittel:	0,010 42			Mittel:	0,010 46

Tabelle XVI.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 $CO(NH_2)_2HCl$, n/20 . . . . 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. . . 10,0 $CO(NH_2)_2HCl$, n/20 2,0 Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 $CO(NH_2)_2HCl$, n/40 . . . . 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. . 10,0 $CO(NH_2)_2HCl$, n/40 2,0 Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0 H_2O . . . . . 2,0 Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0 H_2O . . . . . 2,0 Extrakt 2,0		k_2
		Acidität				Acidität				Acidität		
		allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt	
	ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm	
Anfänglich	9,9	9,95	—	—	7,2	7,22	—	—	4,5	4,6	—	—
1	9,84	10,04	0,2	—	7,28	8,23	0,95	(0,006 04)	4,6	6,8	2,2	(0,014 12)
2	9,92	10,33	0,41	—	7,28	10,4	3,12	0,010 08	4,58	7,98	3,4	0,011 01
3	9,84	10,28	0,44	—	7,3	11,24	3,94	0,008 54	4,6	9,92	5,32	0,011 65
4	9,81	10,26	0,45	—	7,32	12,35	5,03	0,008 24	4,68	11,6	6,92	0,011 51
5	9,73	10,33	0,6	—	7,31	12,80	5,58	0,007 35	4,7	13,24	8,54	0,011 51
							Mittel:	0,008 55			Mittel:	0,011 42

Tabelle XVII.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0, $CO(NH_2)_2HCl$, n/80 . . . . 2,0, Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0, $CO(NH_2)_2HCl$, n/80 . . . . . 2,0, Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0, $CO(NH_2)_2HCl$, n/160 . . . . 2,0, Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0, $CO(NH_2)_2HCl$, n/160 . . . . 2,0, Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0, H_2O . . . . . 2,0, Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0, H_2O . . . . . 2,0, Extrakt 2,0		k_2
		Acidität				Acidität				Acidität		
		allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt	
	ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm	
Anfänglich	5,2	5,24	—	—	4,71	4,84	—	—	4,2	4,22	—	—
1	5,21	6,61	1,4	(0,008 93)	4,8	6,5	1,7	0,010 87	4,31	6,25	1,94	(0,012 42)
2	5,28	8,30	3,02	0,009 75	4,84	8,24	3,6	0,011 67	4,24	7,88	3,64	0,011 81
3	5,31	10,02	4,71	0,010 27	4,9	9,8	4,9	0,010 69	4,26	9,29	5,03	0,010 99
4	5,4	11,22	5,82	0,009 60	5,13	11,43	6,3	0,010 43	4,21	10,56	6,35	0,010 52
5	5,4	12,34	6,94	0,009 24	5,2	13,05	7,85	0,010 52	4,3	12,21	7,91	0,010 61
			Mittel:	0,009 71			Mittel:	0,010 82			Mittel:	0,010 98

Tabelle XVIII.

Zum Versuch dienende Konzentration des Harnstoffchlorids	Gehalt des Harnstoffchlorids im wirkenden Gemisch		Proz.-Gehalt des freien Harnstoffs	Wirkung
	nach dem Volumen ccm	in Gewichtsprozenten	Proz.	
n/20	2,0	0,0689	0,0428	gehemmt
n/40	2,0	0,0344	0,0214	verzögert
n/80	2,0	0,0172	0,0107	"
n/160	2,0	0,0086	0,0053	ist wirkungslos

Tabelle XIX.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/20 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/20 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/40 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/40 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2
		Acidität				Acidität				Acidität		
		allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt	
	ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm	
Anfänglich	9,8	9,9	—	—	7,2	7,3	—	—	4,6	4,7	—	—
1	9,87	10,03	0,16	—	7,3	8,35	1,05	(0,006 68)	4,6	6,80	2,2	(0,014 12)
2	9,76	10,01	0,34	—	7,28	10,52	3,24	0,010 48	4,65	8,15	3,5	0,011 34
3	9,8	10,2	0,4	—	7,28	11,52	4,24	0,009 21	4,55	10,01	5,46	0,011 97
4	9,7	10,1	0,4	—	7,28	12,6	5,32	0,008 72	4,74	11,8	7,06	0,011 76
5	9,65	10,2	0,55	—	7,31	12,95	5,64	0,007 43	4,8	13,2	8,4	0,011 31
							Mittel:	0,008 96			Mittel:	0,011 59

Tabelle XX.

Zeit in Stunden	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/80 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/80 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/160 . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; $CO(NH_2)_2HNO_3$, n/160 . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2	Kontrolle: H_2O . . . . . 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt 2,0	Triacetin, 1 proz. 10,0; H_2O . . . . . 2,0; Extrakt 2,0		k_2
		Acidität				Acidität				Acidität		
		allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt			allgemein	verstärkt	
	ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm		ccm	ccm	ccm	
Anfänglich	5,10	5,12	—	—	4,7	4,8	—	—	4,1	4,12	—	—
1	5,17	6,5	1,33	(0,008 48)	4,7	6,23	1,53	(0,009 77)	4,19	6,06	1,87	0,011 97
2	5,17	8,3	3,13	0,010 11	4,92	9,08	4,16	0,013 54	4,05	8,15	4,1	0,013 35
3	5,4	10,05	4,65	0,010 13	5,21	10,47	5,26	0,011 51	4,16	9,37	5,21	0,011 40
4	5,47	11,43	5,96	0,009 84	5,14	11,7	6,56	0,010 88	4,16	10,68	6,52	0,010 84
5	5,6	12,7	7,1	0,009 46	5,3	13,05	7,75	0,010 38	4,3	12,06	7,76	0,010 45
			Mittel:	0,009 88			Mittel:	0,011 56			Mittel:	0,011 59

Tabelle XXI.

Zum Versuch dienende Konzentration des Harnstoffnitrats	Gehalt des Harnstoffnitrats im wirkenden Gemisch		Proz.-Gehalt des freien Harnstoffs	Wirkung
	nach dem Volumen ccm	in Gew.-Proz.	Proz.	
n/20	2,0	0,0878	0,0428	gehemmt
n/40	2,0	0,0439	0,0214	verzögert
n/80	2,0	0,0219	0,0107	"
n/160	2,0	0,0109	0,0053	ist wirkungslos

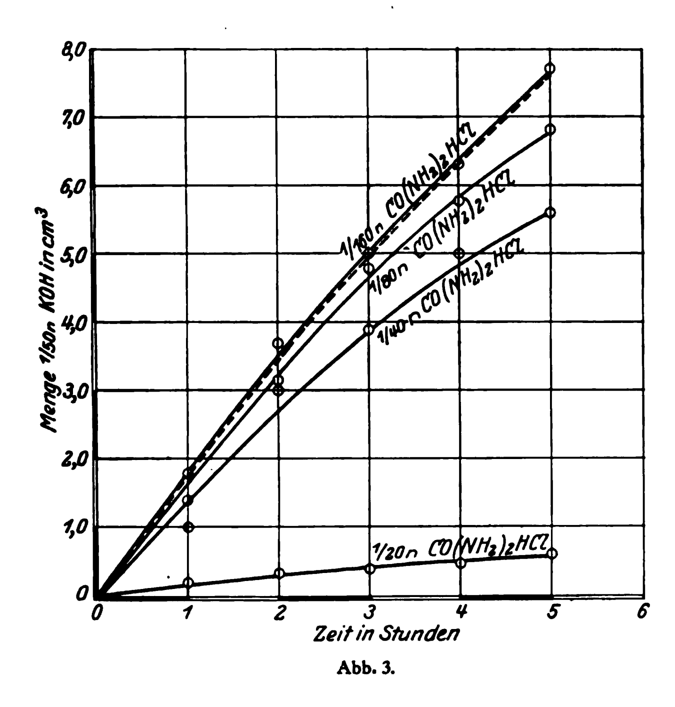


Abb. 3.

Schlüsse:

1. Zum Unterschied von anderen Substraten wird die Spaltung des 1proz. Triacetins durch Pankreaslipase bei Gegenwart von Chininchlorid und Chininsulfat ihrer Konzentration proportional etwas beschleunigt.

2. Chininchlorid beschleunigt die Wirkung der Lipase in Konzentrationen von 0,22 bis 0,05 Proz.; bei einem Gehalt von 0,01 Proz. im Medium wird es unwirksam.

3. 0,026- bis 0,013proz. Chininsulfatlösungen beschleunigen in sehr geringem Maße die Spaltung des Triacetins durch Lipase, während 0,007proz. Lösungen den Prozeß nicht beeinflussen.

4. Eine Doppelverbindung von Harnstoff und Chininchlorid hebt bei einem Gehalt von 0,6 Proz. des Gemisches die Wirkung der Lipase auf, verzögert den Prozeß bei einem Gehalt von 0,4 bis 0,16 Proz. und ist bei einer Konzentration von 0,08 Proz. unwirksam.

5. Freier Harnstoff übt auf Lipase keine merkliche Wirkung aus; die Salze, das Chlorid und das Nitrat verzögern die Spaltung des Triacetins, das erstere bei 0,07 bis 0,017 Proz., das letztere bei 0,08 bis 0,02 Proz. Bei Konzentrationen von 0,009 bzw. 0,01 Proz. üben beide Salze auf den Prozeß keinen Einfluß aus.

6. An der Wirkung der Chininpräparate auf die Lipase sind sowohl die Anionen als auch die Kationen beteiligt: die SO_4''-Ionen erhöhen die beschleunigende Wirkung des Alkaloids, während die Harnstoffsalze dieselbe im Doppelsalz unterdrücken.

7. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse des Triacetins durch die Pankreaslipase sowohl bei Gegenwart von Chinin und Harnstoff als auch ohne dieselben folgt dem Gesetz der monomolekularen Reaktionen, das durch die Gleichung $k = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{a}{a - x}\right)$ ausgedrückt wird.

8. Die Lipase ist dem Chinin gegenüber im Vergleich zur Tryptase und zur Amylase etwas weniger empfindlich.

9. Im allgemeinen wirken die untersuchten Präparate auf die Lipase ebenso wie auf die Amylase.

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Arsens.

Von

Ivar Bang †.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 15. Juni 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei allen jetzt üblichen Methoden der Arsenbestimmung in verschiedenen Gegenständen wird das Arsen unter Kochen mit Salzsäure (sogenannte Schneiderdestillation) in eine Vorlage überdestilliert. Bei den meisten Methoden zur quantitativen Bestimmung wird das Arsen zunächst in der Vorlage isoliert, indem man es als Sulfid ausfällt. Dagegen wird das Arsen in der Vorlage *nicht direkt* durch Titrierung bestimmt. Der Grund dafür ist nicht, daß man das Arsen nicht direkt titrimetrisch bestimmen *kann*. Im Gegenteil, wir besitzen außerordentlich feine Titrierungsmethoden für Arsen in Lösung. Auch das ist nicht der Grund, daß das Arsen sich in der Vorlage nicht in einer Form fände, daß es direkt titriert werden könnte. Ebensowenig ist die verhältnismäßig bedeutende Salzsäuremenge ein absolutes Hindernis für die Ausführung der Titrierung. Andererseits ist es zweifellos viel bequemer und zeitsparender, das Arsen sofort direkt in der Vorlage zu bestimmen, ohne es dort erst zu isolieren, um dann nach erneuter Lösung die Schlußtitrierung auszuführen. Dazu kommt, daß man besonders bei geringen Arsenmengen, um die es sich gewöhnlich handelt, bei dem Reinigungsprozeß einen Verlust an Arsen riskiert, was man bei direkter Titrierung des Destillats natürlich nicht zu befürchten hat. Wenn man daher immer der umständlichen, sogar a priori weniger genauen Methode vor der einfachen direkten Titrierung den Vorzug gegeben hat, so liegt die Ursache sicherlich darin, daß man von der bestimmten Voraussetzung ausging, daß andere fremde Stoffe bei der Schneiderdestillation mit in die Vorlage übergehen und durch ihre Gegenwart eine direkte titrimetrische Bestimmung des Arsens unmöglich machen würden. Diese Annahme ist auch sicher richtig, wenn der Gegenstand, der untersucht werden soll, direkt einer Schneiderdestillation unterworfen wird. Sehr oft, namentlich wenn der Gegenstand organische Stoffe enthält, gehen Verunreinigungen in die Vorlage über, die jede oxydimetrische Arsenbestimmung unmöglich machen, weil sie selber reduzierend wirken. Auch wenn man das Arsen zu reinigen sucht, indem man es als Sulfid aus dem Destillat

ausfällt, läuft man Gefahr, daß die nachfolgende Titrierung des Arsensulfids unrichtig ausfällt, weil die Verunreinigungen trotzdem in den Sulfidniederschlag mitgerissen sein können.

Die Voraussetzung dafür, daß das Arsen bei der Schneiderdestillation direkt titrimetrisch in der Vorlage bestimmt werden kann, ist also die, daß *nur* Arsen übergeht oder daß jedenfalls mit dem Arsen *nur* solche Stoffe übergehen, die nicht auf die titrimetrische Bestimmung des Arsens einwirken.

Hat man sich diesen Umstand einmal klargemacht, so ist es nicht weiter schwer, den Weg anzugeben oder zu finden, der zur Lösung des Problems führt. Wenn man sämtliche organischen Stoffe in dem Gegenstand durch Verbrennung zerstört, ehe man die Schneiderdestillation ausführt, so fällt ja die Fehlerquelle, was die organischen Stoffe betrifft, weg. Und von den anorganischen Stoffen, die in Frage kommen, kann man schon von vornherein die meisten ausschließen. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um Antimon, das jedoch in Wirklichkeit nicht schwer als Verunreinigung zu vermeiden ist, jedenfalls in Mengen, die praktische Bedeutung haben. Durch eine vorangehende Verbrennung wird man also in den Stand gesetzt, das Arsen so rein zu destillieren, daß es ohne weiteres titrimetrisch in der Vorlage bestimmt werden kann. Aber man erzielt dabei zugleich einen sehr wesentlichen Vorteil. Wird die Schneiderdestillation direkt mit dem arsenhaltigen Gegenstand vorgenommen, so liegt die Möglichkeit vor, daß ein größerer oder kleinerer Teil des Arsens nicht als Trichlorid in die Vorlage überdestilliert, sondern im Gegenstand zurückbleibt. Daß diese Möglichkeit bei viel Raum einnehmenden Gegenständen wirklich recht oft eintrifft, wird später gezeigt werden. Dazu kommt, daß das Arsen, was als organische Arsenverbindung vorhanden ist, möglicherweise oder wahrscheinlich ganz oder teilweise sich der Bestimmung entzieht, indem es beispielsweise in Form flüchtiger Arsenverbindungen entweichen kann, die bei der Bestimmung verloren gehen. Wird dagegen der Gegenstand vor der Destillation vollkommen verbrannt, so fallen diese Fehlerquellen weg. Alles Arsen liegt dann in anorganischer Form vor und geht in seiner Gesamtheit als Trichlorid in die Vorlage über. Dies jedoch nur unter der Voraussetzung, daß kein Arsen bei der Verbrennung selbst verloren geht. Die letzterwähnte Möglichkeit ist tatsächlich die Schwierigkeit, an der viele Methoden gestrandet sind. Bei unvorsichtiger Verbrennung, besonders auf trockenem Wege, kann leicht Arsen verloren gehen. Das Vorgehen bei einer einfachen und zuverlässigen Methode zur Arsenbestimmung muß daher im Prinzip das sein, daß der betreffende Gegenstand zunächst am besten auf nassem Wege verbrannt wird, etwas, was die nachfolgenden Manipulationen in hohem Grade erleichtert. Das Resi-

duum wird dann einer **Schneiderdestillation** unterworfen, worauf das Arsen durch direkte Titrierung des Destillats bestimmt wird. Eine solche Methode bietet im großen und ganzen eine vollständige Analogie zu unserer gebräuchlichsten Methode der Stickstoffbestimmung — der **Kjeldahlmethode**. Hier wird der Gegenstand auf nassem Wege vermittelst Schwefelsäure verbrannt, worauf aller Stickstoff, und nur dieser, in Form von Ammoniak überdestilliert wird, um schließlich in der Vorlage titrimetrisch bestimmt zu werden. Bei der Arsenmethode wird ebenfalls zuerst eine Verbrennung auf nassem Wege vorgenommen — wobei Schwefelsäure und Salpetersäure vor allem in Betracht kommen —, dann wird das Arsen allein als Trichlorid überdestilliert und titrimetrisch im Destillat bestimmt. Es ist in der Tat gerade **Kjeldahls** Methode, die dem Verfasser die Idee zu der Methode der Arsenbestimmung gegeben hat, die im folgenden beschrieben werden soll.

Wie im vorangehenden angedeutet ist, kann das Verfahren zur Bestimmung des Arsens in den verschiedenen Gegenständen, die in Frage kommen, in folgende Momente eingeteilt werden: 1. die Verbrennung der Substanz, wodurch sich schließlich alles Arsen als Arsensäure in Lösung befindet; 2. die Reduktion der Arsensäure zu arseniger Säure und die Überdestillation dieser in eine Vorlage; 3. die titrimetrische Bestimmung des Arsens als arsenige Säure in der Vorlage.

Die Verbrennung gestaltet sich je nach der Beschaffenheit des vorliegenden Gegenstandes etwas verschieden — je nachdem es eine Flüssigkeit oder ein fester Körper ist, ob er voluminös und reich an organischen Stoffen ist oder nicht. Dagegen erfolgt die Destillation und Titrierung des Arsens natürlich immer in der gleichen Weise.

1. Die Verbrennung.

Die Verbrennung des Gegenstandes geschieht auf nassem Wege vermittelst Salpeter- und Schwefelsäure. Dieses Verfahren ist keineswegs neu, sondern im Gegenteil schon seit langer Zeit gebräuchlich. Es sind tatsächlich nur ein paar Einzelheiten, die von der früheren Methode abweichen. Aber gerade durch diese Abweichungen glaube ich eine schnellere und vollständigere Verbrennung zu erreichen, ohne daß ein Verlust an Arsen stattfindet. Diese Vorteile werden durch die *Art* erreicht, wie die Quantität der Salpetersäure im Verhältnis zur Schwefelsäure reguliert wird, und die *Art*, wie die Salpetersäure zugeführt wird. Das Verfahren ist folgendes:

Der Probe werden zunächst in einem 300-ccm-**Kjeldahl**kolben 20 bis 22 ccm arsenfreier konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt (wenn nötig, mehr, darüber näheres später). Der Kolben wird geschüttelt, so daß die Probe vollständig von der Schwefelsäure befeuchtet wird, dann erwärmt man vorsichtig über einem Mikrobrenner bis zur eben beginnenden Verkohlung. Jetzt wird unter fortgesetzter Erwärmung konzentrierte rauchende arsenfreie Salpetersäure Tropfen für Tropfen zugesetzt (mit 4 bis 8 Sekunden Zwischenraum). Am besten verwendet man dazu einen Tropftrichter mit langem, zweifach winklig gebogenem Ausflußrohr (s. Abb. 1).

Man vermeidet dabei wie immer, die Salpetersäure am Kolbenhals entlang hinabfließen zu lassen, sondern tropft sie direkt in die Schwefelsäure. (Sonst wird das Glas leicht brüchig.) Hiermit fährt man fort, bis die Flüssigkeit sich vollständig geklärt und eine gelbe Farbe angenommen hat. Das Oxydationsvermögen der Salpetersäure wird vollkommener ausgenutzt, wenn sie tropfenweise zugesetzt wird, als wenn größere Mengen auf einmal zugeführt werden. Ferner wirken die entstehenden nitrosen Gase als ein kräftiger Katalysator bei dem weiteren Salpetersäurezusatz. Dadurch wird die Salpetersäurezufuhr ungefähr auf das Minimum dessen beschränkt, was streng notwendig ist, um eine vollständige Verbrennung zu erzielen. Nach beendeter Salpetersäurezufuhr, wobei je nach Beschaffenheit des Gegenstandes sehr verschiedene Mengen gebraucht werden, wird die Flüssig-

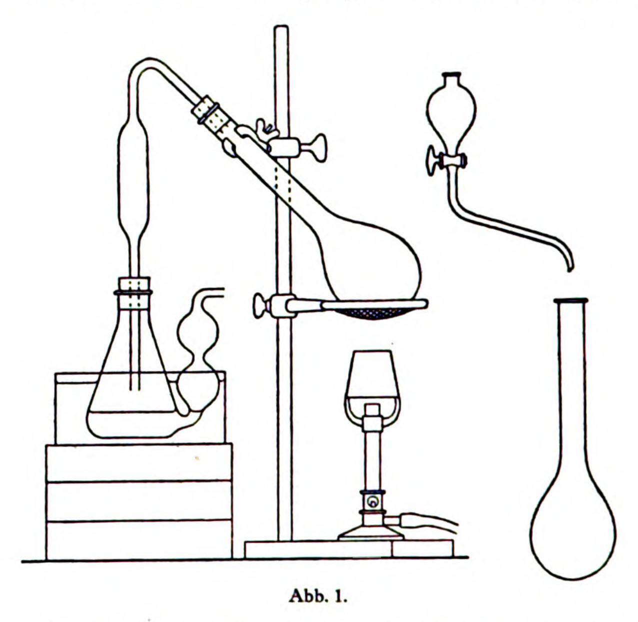


Abb. 1.

keit über voller Flamme erwärmt. Ist die Verbrennung vollständig, so bleibt die Flüssigkeit klar und entfärbt sich gewöhnlich vollkommen. Sind Spuren organischer Substanz zurückgeblieben, so färbt sich die Flüssigkeit etwas dunkler, wird aber nach kürzerer Zeit doch vollständig von der Schwefelsäure oxydiert. Dabei kann man indessen einen Verlust an Arsen riskieren. Tritt daher die geringste Dunkelfärbung der Flüssigkeit bei der Erhitzung ein, so wird die Salpetersäurebehandlung fortgesetzt, indem man die Hitze vermindert und tropfenweise Salpetersäure zusetzt. Nach Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure, mehr oder weniger je nach Bedarf, wird die Erhitzung mit Schwefelsäure allein fortgesetzt. Wenn die Farbe sich nach 5 bis 10 Minuten langer Erhitzung nicht ändert, ist die Verbrennung vollständig.

Unter günstigen Umständen ist nach beendeter Verbrennung alle Salpetersäure vollständig verbraucht und die Flüssigkeit zur Reduktion fertig. Im allgemeinen dürfte indessen ein geringer Überschuß von Salpetersäure und damit zugleich ein recht beträchtlicher an nitrosen Gasen als

Nitrosylschwefelsäure vorhanden sein. *Beide Bestandteile müssen absolut vollständig entfernt werden, ehe man weiter geht.* Sonst ist die Analyse merkbar verloren. Die Salpetersäure entweicht vollständig bei fortgesetzter Erwärmung, die nitrosen Gase dagegen *nicht.* Um beide zu entfernen, habe ich verschiedene Wege versucht, z. B. die Reduktion mit Harnstoff. Nach meiner Erfahrung ist folgendes Verfahren das einfachste und praktischste. Man setzt nach Abkühlung 50 ccm Wasser zu, wodurch eine vollständige Dissoziation der Nitrosylschwefelsäure eintritt. Dies zeigt sich daran, daß sich der Kolben mit braunem Dampf füllt. Ferner setzt man einige Kochsteine zu, da die Flüssigkeit bei fortgesetztem Kochen sonst ziemlich stark stößt. Darauf wird alles Wasser weggekocht, womit zugleich die nitrosen Gase entfernt werden. Von dem Augenblick an, wo weißer Schwefelsäuredampf im Kolben auftritt, wird das Kochen noch 15 Minuten fortgesetzt. Im Laufe dieser Zeit wird alle Salpetersäure vertrieben; jetzt wird die Flamme entfernt und der Kolben zur Abkühlung hingestellt.

Im allgemeinen ist die Flüssigkeit jetzt völlig farblos. Bei Abwesenheit anorganischer Farbstoffe ist dies indes nicht immer der Fall. Man kann dann nicht nach der Farbe beurteilen, ob die Verbrennung beendet ist. In solchen Fällen muß man nach beendeter Verbrennung folgende Probe anstellen. Wenn der Inhalt des Kolbens etwas abgekühlt ist, setzt man 30 ccm Wasser und einige kleine Kristalle Permanganat zu. Ist alles verbrannt, so behält die warme Flüssigkeit ihre rote Farbe unverändert bei, anderenfalls tritt Entfärbung ein. Man muß dann, nachdem man das Wasser weggekocht hat, die Verbrennung mit Salpetersäure fortsetzen.

Was dieser Verbrennungsmethode den Vorzug vor den früher angewendeten gibt, ist zunächst der Umstand, daß die Verbrennung sehr rasch vor sich geht, daß sie weniger Aufsicht erfordert und weniger Oxydationsmittel verbraucht. Ferner ist die Verbrennung *vollständig.* Und endlich geht die Verbrennung so langsam vor sich und bei dem kritischen Zeitpunkt — im Anfang —, wo sonst ein Verlust an Arsen erfolgen kann, unter so mäßiger Erwärmung und unter ständiger Zufuhr von Salpetersäure, daß sich kein Arsen verflüchtigt.

Diese allgemeine Verbrennungsmethode erfordert indessen gewisse kleine Modifikationen je nach der Beschaffenheit der zu untersuchenden Gegenstände.

Was Gegenstände wie Tapeten, Stoffe, Garn, Teppiche, Farbstoffe abgekratzte Bemalung usw. betrifft, so nimmt man zur Analyse die in der geltenden Giftverordnung[1]) vorgeschriebenen Mengen. Die Probe wird zunächst fein zerteilt und in den Kjeldahlkolben gebracht, worauf Schwefelsäure zugesetzt wird. Voluminöse Stoffe, wie z. B. Teppiche, erfordern mehr Schwefelsäure als oben gesagt ist, um verbrannt zu werden, weil der Gegenstand gut mit der Säure durchfeuchtet sein muß, ehe der Salpetersäurezusatz beginnen kann. Alle Stoffe, die Fett enthalten, erfordern viel mehr Salpetersäure und brauchen auch längere Zeit zur Verbrennung.

Harnproben und andere Flüssigkeiten, wie Wasser und Bier, erfordern eine etwas andere Behandlung als die oben beschriebene. Vom Harn wird ein Zehntel der Tagesmenge in einen Maßzylinder gebracht. Darauf wird ein Fünftel des genannten Volumens rauchender Salpetersäure unter Umrühren zugesetzt. Dann werden 100 bis 150 ccm des Gemisches in den Kjeldahlkolben gefüllt, während der Rest in den über dem Kolben befind-

[1]) Bezieht sich auf die im Jahre 1917 in Schweden geltende Giftverordnung.

lichen Tropftrichter gegossen wird (s. Abb. 1). Ein paar Kochsteine (erbsengroße Scherben von einem *Daniell*schen Tonzylinder) werden in den Kolben geworfen, und dieser wird nun zum Kochen erhitzt. Im allgemeinen tritt anfangs starke Schaumbildung auf, die es nötig macht, die Flamme einige Augenblicke zu entfernen. Das Kochen erfolgt dann ruhig und regelmäßig unter beständigem Tropfen aus dem Trichter. Wenn das ganze Volumen auf etwa 50 ccm konzentriert ist, werden auf einmal einige Kubikzentimeter Salpetersäure zugesetzt, und das Kochen wird fortgesetzt, bis nur noch 10 bis 15 ccm übrig sind[1]). Nach Abkühlung wird die Flüssigkeit auf Chlor geprüft. (Mit einem Kapillarrohr wird ein Tropfen entnommen und in eine Silbernitratlösung getropft.) Ist Chlor vorhanden, so werden noch einige Kubikzentimeter Salpetersäure und 10 bis 15 ccm Wasser zugesetzt, und man fährt mit Kochen fort, bis die Flüssigkeit abermals auf 10 bis 15 ccm konzentriert ist. (Eine schwache positive Chlorreaktion ist bedeutungslos. In Wirklichkeit habe ich dieses zweite Eindampfen nur sehr selten auszuführen brauchen.)

Nach Abkühlung der Flüssigkeit werden vorsichtig 25 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt[2]). Bei dem Zusatz tritt nämlich von neuem starke Schaumbildung auf. Man vermeidet dies, wenn man die Säure vorsichtig und unter Umschütteln zusetzt. Darauf erfolgt die Verbrennung wie gewöhnlich unter tropfenweisem Zufügen von Salpetersäure. Ausnahmsweise kann bei verdünntem Harn von niedrigem spezifischen Gewicht die ganze Verbrennung während des Eindampfens vor sich gehen. Sollte bei der Verbrennung eine größere Menge Schwefelsäure verbraucht werden, als berechnet, was man nach dem Volumen der Lösung nach der Verbrennung beurteilen kann, so muß der Verlust ersetzt werden, ehe man die Destillation vornehmen kann. Dies kann entweder annähernd geschehen, indem man das Volumen im Destillationskolben mit einem anderen Kjeldahlkolben vergleicht, der 22 ccm Wasser enthält. Will man genau vorgehen, so muß man den Kolben nach der Verbrennung wägen. Das Eigengewicht des Kolbens abgerechnet, soll das Gewicht durchschnittlich etwa 40 g betragen.

Obige Beschreibung gilt für die Harnanalyse. Andere Flüssigkeiten werden in gleicher Weise behandelt. Da sie im allgemeinen ärmer an organischen Stoffen sind als Harn, vollzieht sich die Verbrennung rascher. Sollten sie dagegen reicher an organischer Substanz sein, so braucht man mehr Salpetersäure, und die Verbrennung erheischt größere Vorsicht.

Nahrungsmittel: a) *Vegetabilien*, wie Korn, Graupen, Reis, Erbsen, Bohnen u. dgl. 10 g[3]) werden abgewogen, in den Kjeldahlkolben gebracht und mit 25 ccm Wasser und 25 ccm konzentrierter Schwefelsäure übergossen. Beim Umschütteln tritt beginnende Schwärzung ein. *Vorsichtig*

[1]) Mehrmals sind hierbei plötzliche explosionsartige Stöße aufgetreten, so daß der Inhalt des Kolbens verloren ging. Dies ist nur bei Harnproben, die reich an Zucker oder Eiweiß waren, vorgekommen; es ist daher besser, diese Stoffe, wenn sie in etwas größeren Mengen vorhanden sind, vorher zu entfernen.

[2]) Da ein Teil der Schwefelsäure zur Neutralisierung der im Harn vorhandenen Alkalien verbraucht wird, muß man hier etwas mehr nehmen, als sonst vorgeschrieben ist.

[3]) Handelt es sich um stärker wasserhaltige Vegetabilien, wie z. B. Kohl usw., so nimmt man zur Analyse eine Menge, die 10 g Trockensubstanz entspricht.

wird nun *ohne Erwärmung* tropfenweise rauchende Salpetersäure zugesetzt. Bei jedem Zusatz tritt starkes Schäumen ein, besonders im Anfang. Droht die Flüssigkeit überzuschäumen, so kann man durch rasche Abkühlung das Schäumen eindämmen. Man fügt nicht eher wieder neue Salpetersäure zu, bis das Schäumen vom letzten Male aufgehört hat. Tritt bei Salpetersäurezusatz keine Schaumbildung mehr auf, so wird die Flüssigkeit im *Wasserbade* erwärmt, bis vollständige Lösung eingetreten ist und die Flüssigkeit eine gelbbraune Farbe angenommen hat. Darauf wird die Erwärmung vorsichtig über einem Mikrobrenner vorgenommen, bis alles Wasser verdampft ist und wieder eine beginnende Verkohlung auftritt. Jetzt beginnt von neuem die Zufuhr von Salpetersäure durch den Tropftrichter, worauf die Verbrennung nach dem allgemeinen Schema beendet wird. Weil eine beträchtliche Menge Salpetersäure gebraucht wird — 50 bis 100 ccm — ist das Volumen derselben zu notieren und eine Korrektur für eventuell darin vorhandenes Arsen vorzunehmen, indem man den eventuellen Arsengehalt der Salpetersäure in einem besonderen Versuch ein für allemal bestimmt.

b) *Animalische Nahrungsmittel*, wie Fleisch, Fisch usw., sind schwieriger zu verbrennen als alle vorhergehenden Proben. Namentlich ist das Fett schwer zu bewältigen. Daher gestaltet sich die Verbrennung um so mühsamer, je fettreicher der Gegenstand ist. Die Verbrennung nimmt dann längere Zeit in Anspruch, erfordert größere Quantitäten Salpetersäure, und die Flüssigkeit hat größere Neigung, überzuschäumen. Die Verbrennung ist überhaupt eine große Geduldsprobe. Man kann aber gut mehrere Analysen auf einmal in Arbeit haben, da alle Proben gleichzeitig besorgt werden können.

50 bis 100 g am besten fein gemahlenen Materials werden in den Kjeldahlkolben gebracht und mit 25 bis 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure übergossen. Die Mischung wird gut umgeschüttelt, wobei Wärme entsteht. Dann wird *sehr vorsichtig* tropfenweise konzentrierte Salpetersäure zugesetzt ohne weitere Erwärmung. Im allgemeinen tritt bei jedem Salpetersäurezusatz starkes Schäumen ein. Auch hier geht das Schäumen bei Abkühlung zurück. Wenn das erste Schäumen vorüber ist und weiterer Salpetersäurezusatz keine Schaumbildung mehr veranlaßt, geht man zur Erwärmung im Wasserbade über, wobei man tropfenweise Salpetersäure zuführt. Dabei entsteht neue Schaumbildung, weshalb auch weiterhin Vorsicht erforderlich ist. Schließlich — in der Regel nach mehreren Stunden — ist die Probe aufgelöst und die Flüssigkeit nimmt eine braunrote Farbe an. Darauf wird die Erwärmung auf dem Mikrobrenner fortgesetzt, und wenn alles Wasser verdampft ist, erfolgt die Verbrennung schließlich nach dem allgemeinen Schema. Eine Schaumbildung tritt jetzt nur noch bei besonders fetthaltigem Material ein. Man sieht dann eine Fettschicht oben auf der Flüssigkeit schwimmen, die teils eine beträchtliche Menge Salpetersäure zu ihrer Verbrennung erfordert, teils die Schaumbildung bei Salpetersäurezusatz verursacht. In diesem Falle muß man daher auch weiterhin Salpetersäure mit Vorsicht zufügen. Das verbrauchte Salpetersäurevolumen ist für eventuelle Korrektur zu notieren. Die Salpetersäure ist nämlich selten vollkommen arsenfrei.

2. Reduktion und Destillation.

Nach beendeter Verbrennung liegt alles Arsen in Form von Arsensäure vor. Damit diese destilliert werden kann, muß sie erst zu arseniger Säure reduziert werden, die als Arsentrichlorid in die Vorlage übergeht und hier oxydimetrisch bestimmt wird. Nachdem der Kolben durch Wegnehmen der

Flamme abgekühlt ist, kann man in der Regel gleich dazu übergehen, die Arsensäure zu reduzieren. Bisweilen ist jedoch ein großer Teil der Schwefelsäure verbraucht (nämlich wenn das Material aus Teppichen oder fettreichen Stoffen, eventuell auch Farbstoffen bestanden hat). Man muß dann erst den Verlust an Schwefelsäure ersetzen, was dadurch geschehen kann, daß man Schwefelsäure bis ungefähr zu dem gleichen Volumen nachfüllt, wie es 22 ccm Wasser in einem anderen 300-ccm-Kjeldahlkolben einnehmen. Im allgemeinen dürfte dies jedoch überflüssig sein. Einige Kubikzentimeter Schwefelsäure mehr oder weniger haben nämlich keine Einwirkung auf das Resultat. 30 ccm Wasser und ein Teelöffel Mohrs Salz oder die gleiche Menge Ferrosulfat[1]) in Substanz werden zugesetzt, wodurch die Arsensäure zu arseniger Säure reduziert wird, die mit Salzsäure Arsentrichlorid bildet, das beim nachfolgenden Kochen mit Salzsäuredämpfen überdestilliert.

Nachdem die Flüssigkeit von neuem abgekühlt ist, wird die Destillation vorgenommen. Zunächst wird das untere Ende des Destillationsrohres vermittelst eines Gummipfropfens (der fest am Rohr sitzt) mit einem 300-ccm-Fresenius-Kolben vereinigt, der 30 ccm 20 proz. nitritfreie Natronlauge und 100 ccm destilliertes Wasser und 2 Tropfen Phenolphthalein enthält. Darauf werden in den Destillationskolben 20 g reines Chlorkalium eingeführt, das kein Arsen oder andere reduzierende Stoffe, die in die Vorlage übergehen könnten, enthalten darf, und ein Teelöffel Bromkalium hinzugefügt. Der Kolben wird unmittelbar mit dem Destillationsrohr verbunden, entweder durch einen am Rohr festsitzenden Gummipfropfen[2]) oder durch Glasverbindung. Kolben letzterer Art mit eingeschliffenem Hals und dazu passender Glasverbindung am Destillationsrohr sind überhaupt vorzuziehen, aber sie sind teuer und gehen leicht entzwei. Die Glasverbindung zwischen Kolben und Destillationsrohr wird vorher mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure angefeuchtet, um das Auseinandernehmen nach der Destillation zu erleichtern. Der Freseniuskolben taucht während der Destillation teilweise in ein mit kaltem Wasser gefülltes Becherglas ein, um eine Erwärmung des Inhalts zu verhindern (s. Abb. 1). Die Spitze des Destillationsrohres darf die Flüssigkeit in der Vorlage *nicht* berühren. Dadurch vermeidet man ein Zurücksaugen der Flüssigkeit bei unregelmäßigem Kochen. Nun wird der Kolben über einem Drahtnetz mit einem kräftigen Bunsenbrenner erwähnt, wobei zunächst die Luft vertrieben wird. Später entwickelt sich ein kräftiger Strom von Salzsäuregas, das nicht vollständig von der Lauge in der Vorlage absorbiert wird, sondern zum Teil durch das Seitenrohr des Freseniuskolbens entweicht. Zahlreiche Versuche haben indessen gezeigt, daß auch nicht Spuren von Arsen die Lauge passieren und mit dem Salzsäuregas entweichen. Alles Arsen wird von der Lauge in der Vorlage zurückgehalten, auch wenn das Gas in kräftigem Strom entweicht. Allmählich beginnt die rote Farbe in der Vorlage wieder zum Vorschein zu kommen. Ungefähr gleichzeitig nimmt der Gasstrom ab und die Salzsäure geht zusammen mit dem Wasser über. Schließlich färbt sich die Flüssigkeit in der Vorlage intensiv rot und wird dann im Laufe

---

[1]) Ferrosulfat ist als kräftigeres Reduktionsmittel gewiß vorzuziehen.

[2]) Die Pfropfen dürfen keine reduzierende Substanz abgeben. Gummipfropfen müssen vor der Anwendung einige Tage in konzentrierter Chlorwasserstoffsäure liegen. Vor dem Kriege waren gute Gummipfropfen leicht erhältlich. Jetzt ist es unmöglich, eine brauchbare Sorte aufzutreiben.

einiger Sekunden farblos. Jetzt wird die Destillation abgebrochen und die Vorlage entfernt.

Vor dem Kriege erhielt man bei Anwendung von Kaliumchlorid allein — *Kahlbaums* Präparat „pro analysi mit Garantieschein" — ohne Zusatz von Bromid gute Werte. Später, als wir unser Kaliumchlorid selber rein darstellen mußten, wurden die Resultate schlechter, insofern, als wir immer zu niedrige Werte erhielten.

Durch Professor Rambergs Untersuchungen ist die Ursache der wechselnden Resultate aufgeklärt worden. Während Rohmer, Jannasch und andere nachgewiesen haben, daß Zusatz von Bromkalium das Abdestillieren von größeren Arsenmengen erleichtert, fand Ramberg, daß die Anwesenheit von *Bromiden* in geringer Menge eine notwendige Bedingung dafür ist, daß auch kleine Arsensäuremengen von Ferrosulfat in angemessener Zeit vollständig zu arseniger Säure reduziert werden. Fehlen die Bromide, so bleibt die Reduktion unvollständig, und es destilliert infolgedessen nur ein Teil des Arsens über. Daß Kahlbaums Kaliumchlorid viel besser war als das durch Umkristallisieren von mir dargestellte, beruht darauf, daß ich durch die Reinigung das Kaliumchlorid von Kaliumbromid befreite, während Kahlbaums Präparat Bromid enthielt. Diese Möglichkeit war mir entgangen, doch mag zur Entschuldigung dienen, daß Kahlbaums Präparat garantiert rein war mit beigefügter Analyse über vorhandene minimale Verunreinigungen — unter denen indes Kaliumbromid *nicht* aufgezählt war.

Die Wirkung des Bromidzusatzes ist außerordentlich frappant. Bei Anwendung bromidfreien Kaliumchlorids erhielt ich z. B. in einer Analyse 0,750 mg Arsen statt, wie berechnet, 2,00 mg, während in einer anderen Probe mit Bromid (etwa 1 g) 2,02 mg As erhalten wurden. (Übrigens sei auf die untenstehenden Analysen hingewiesen.)

Außer dem Umstand, daß man durch Zusatz kleiner Bromidmengen das Arsen quantitativ reduziert erhält, hat die Gegenwart des Bromids auch andere Vorteile, die die Prozedur recht beträchtlich vereinfachen. Man braucht das Arsen nicht von vornherein mit Mohrs Salz zu reduzieren, sondern kann dies zusammen mit dem Kaliumchlorid zusetzen und dann direkt destillieren. Man kann die Destillationszeit, innerhalb der Grenzwerte, die für die Methode gelten, ganz beträchtlich verkürzen. Man braucht nicht 30 g Kaliumchlorid, wie sie ursprünglich verwendet werden, sondern nur 20 g, um eine genügende Menge Salzsäure für die Destillation zu entwickeln.

Man braucht ferner keinen Kühler am Destillationsapparat. Man riskiert bei dieser kurzen Destillationszeit nicht, daß die Flüssigkeit zu stark eindampft, wobei die Schwefelsäure durch das Ferrosulfat zu schwefliger Säure reduziert werden kann. Diese könnte nämlich übergehen und die Arsenbestimmung im Destillat unmöglich machen. Dieser Möglichkeit entgeht man weiterhin dadurch, daß man die der Schwefelsäure zugesetzte Wassermenge von ursprünglich 20 ccm auf 30 ccm erhöht.

In obiger Beschreibung ist der Zusatz von ganzen 2 g Bromkalium vorgeschrieben, eine bedeutend größere Quantität als Ramberg sie anwendet. Tatsächlich kann man sich mit etwas weniger behelfen, wenn man nämlich das Arsen nach der alten Methode: Kochen mit Mohrs Salz vor der Destillation — reduzieren will. Tabelle I zeigt die Resultate einiger solcher Versuche[1]).

[1]) Mir freundlichst von Prof. Ramberg überlassen.

Tabelle I.

Zugesetztes Br mg	As berechnet mg	As gefunden mg	Differenz mg
10	0,209	0,208	— 0,001
10	0,512	0,502	— 0,010
10	1,008	0,934	— 0,074
40	1,006	1,000	— 0,006

Da man indessen ebensogut einen Teelöffel wie eine Messerspitze Bromkalium nehmen kann, empfehle ich die erste Alternative als bequemer und zeitsparender. Die Resultate einiger Versuche, auf diese Weise ausgeführt, also genau nach obiger Vorschrift, sind in Tabelle II zusammengestellt. Das Arsenik wird als *gewöhnliche Lösung* zugesetzt. Von der Arseniklösung (As_2O_3) werden wechselnde Mengen abgemessen, die zunächst im Kolben mit Permanganat oxydiert werden.

Tabelle II.

As berechnet mg	As gefunden mg	Differenz mg
20,00	19,170	— 0,830
10,00	9,880	— 0,120
7,725	7,676	— 0,049
3,919	3,922	+ 0,003
3,919	3,920	+ 0,001
0,975	0,975	± 0
0,392	0,392	± 0
0,196	0,196	± 0

Wie aus der Tabelle hervorgeht, liefert die Methode exakte Werte bis zu 4 mg Arsen. Von 5 bis 20 mg ist der absolute Verlust gleichmäßig ansteigend. Doch liegt der Fehler bei 7,5 mg As noch innerhalb der bisher offiziell zugelassenen Fehlergrenze. Es ergibt sich daher, daß die Methode für größere Werte als etwa 5 mg nicht als vollkommen exakt betrachtet werden kann. Ihr Gebiet liegt daher zwischen etwa 0,02 mg (s. Tabelle III) und 5 mg oder mit anderen Worten, sie umfaßt die Werte, die bei Untersuchung von Harn, Organen und den meisten Hausgeräten und gewöhnlichen Gegenständen praktisch in Frage kommen. Nur sehr selten dürften größere Werte als etwa 5 mg in den zur Untersuchung bestimmten Proben vorkommen. Sollte dieser Fall doch einmal eintreten, so hat man ja immer den Ausweg, eine kleinere Quantität zu bearbeiten, was jedoch gewisse Übelstände mit sich bringt.

3. Titrierung.

Nach beendeter Destillation wird die Vorlage vom Destillationsrohr entfernt. Der Inhalt, der sauer reagiert, muß vor dem Titrieren neutralisiert werden, was dadurch geschieht, daß man einen Teelöffel reinen Natriumbicarbonats in Substanz zusetzt und umschüttelt. Man beobachtet dabei ein Aufbrausen von Kohlensäure, das jedoch bald aufhört. Wenn die Kohlensäureentwicklung aufgehört hat, soll noch etwas Salz ungelöst übrig sein. Die Flüssigkeit muß nämlich beim Titrieren einen Überschuß davon enthalten. Um den Inhalt im Seitenrohr zu neutralisieren, neigt man den Kolben abwechselnd vor- und rückwärts. Die Flüssigkeitsmenge, die sich

möglicherweise in der obersten Kugel des Seitenrohres abgesetzt hat, wird mit der Spritzflasche herabgespült. Der Kolben wird nun unter der Wasserleitung auf Zimmertemperatur abgekühlt und darauf so viel Wasser zugesetzt, daß der Inhalt ungefähr 150 ccm beträgt. Nach Zusatz von einem Jodkaliumkristall und etwa 10 bis 15 Tropfen einer 1proz. Stärkelösung titriert man mit n/200 Jodlösung bis zur schwachen, aber deutlichen und bleibenden Blaufärbung[1]). Der Umschlag erfolgt bei einem Tropfen. Gegen Schluß der Titrierung muß der Kolben nach jedem zugesetzten Tropfen hin und her bewegt werden, damit der Inhalt des Seitenrohres mit erfaßt wird. Während des Titrierens steht der Freseniuskolben auf einer weißen Unterlage, damit man die Farbe besser beobachten kann.

Bei Berechnung der Analyse geht man von dem Verhältnis: 1 ccm Jodlösung = 0,1875 mg As aus.

4. Reagenzien und Titrierflüssigkeiten.

Zur Bestimmung von Arsen nach der oben geschilderten Methode gehören Reagenzien, die soweit wie möglich arsenfrei sind. Da absolut arsenfreie Reagenzien kaum zu beschaffen sind, muß man immer zunächst durch Blindanalysen sich davon überzeugen, ob diese arsenfrei sind, oder die Arsenmenge bestimmen, die bei jeder Analyse als Verunreinigung eingeht, und diesen Wert als Korrektion einführen[2]). Ich habe bei meinen Blindanalysen immer einen Jodverbrauch von 0,10 bis 0,20 ccm Jodlösung gefunden. Man soll sich, wenn es sich um die Ausführung mehrerer Arsenbestimmungen handelt, einen größeren Vorrat der verschiedenen Reagenzien anschaffen und ein für allemal die gesamte Arsenmenge für alle Reagenzien durch eine Analyse bestimmen. Die Reagenzien sind folgende:

1. *Konzentrierte Schwefelsäure.* Mercks reine Säure erhält man arsenfrei.

2. Reine *konzentrierte rauchende Salpetersäure*, die wohl immer Spuren von Arsen enthält. Man muß daher ein etwas größeres Quantum (300 bis 500 ccm) eindampfen und eine Arsenbestimmung des Rückstandes ausführen. Findet sich Arsen, so hat man immer die zur Verbrennung gebrauchte Salpetersäuremenge zu notieren und das darin enthaltene Arsenquantum zu berechnen.

(3. Chemisch reines Kaliumpermanganat: Der Verbrauch ist höchst unbedeutend.)

4. Mohrs *Salz* oder *Ferrosulfat* in Substanz. Die Handelsware ist im allgemeinen arsenfrei. Im entgegengesetzten Falle wird das Präparat durch Umkristallisieren gereinigt.

5. *Kaliumchlorid.* Kahlbaums Präparat pro analysi ist arsenfrei. Die gewöhnliche Handelsware und die Präparate der Apotheker ergeben einen beträchtlichen Jodverbrauch, ein Fehler, der durch Umkristallisieren leicht auszuschalten ist. Ist die Verunreinigung unbedeutend, so genügt ein *einmaliges* Umkristallisieren, andernfalls muß das Präparat zweimal umkristallisiert werden. Um das Salz zu reinigen, kann man das destillierte Wasser, das zur Umkristallisierung verwendet wird, mit etwas Salzsäure versetzen. Wenn das Wasser — etwa 3 bis 4 Liter — bis zum Kochen erwärmt ist, setzt man das Salz portionsweise zu, solange sich etwas löst,

---

[1]) Dabei ist die Anwendung einer Mikrobürette zu empfehlen.

[2]) Da nur wenig Jodlösung beim Titrieren gebraucht wird, ist eine größere Korrektion als 0,5 bis 1 ccm nicht zweckmäßig. Man besorgt sich dann besser reinere Reagenzien.

worauf man nach Umrühren und kurzem Aufkochen die Flüssigkeit durch ein Saugfilter filtriert. Nach der Auskristallisierung wird die Mutterlauge durch ein Saugfilter abfiltriert, und die Salzmasse wird hier möglichst trocken gesaugt, dann bringt man sie in eine größere Schale, schützt sie vor Staub und läßt das Salz lufttrocken werden. Die Mutterlauge wird weggeschüttet.

6. *Bromkalium.* Da nur geringe Mengen gebraucht werden, nimmt man am vorteilhaftesten ein chemisch reines Präparat. Sonst muß man das Salz umkristallisieren.

7. *Natronlauge,* 20proz. Die Natronlauge darf nach Neutralisation selber kein Jod verbrauchen. Leider sind viele Natronsorten mit Salpeter entfärbt und enthalten dann Nitrit, das Jod verbraucht. Ein aus Natriummetall hergestelltes Präparat ist das beste, aber ziemlich teuer. Kahlbaums Präparat ist ebenfalls nitritfrei. Desgleichen im allgemeinen die aus Ammoniaksoda hergestellten Präparate.

8. *Natrium-* oder *Kaliumbicarbonat,* frei von Arsen. Man benutzt die chemisch reinen Präparate pro analysi.

9. *Jodkalium* in Substanz. Gewöhnliche Handelsware.

10. *Eine 1proz. Stärkelösung,* die man darstellt, indem man 1 g lösliche Stärke in etwa 5 ccm Wasser aufschlämmt und die Mischung in kochende gesättigte KCl-Lösung gießt, wobei die Stärke sich sofort löst und sich steril hält. Die Stärkelösung darf nicht zu alt werden, da eine alte Lösung einen schlechten Umschlag gibt.

11. *n/200 Jodlösung,* die man herstellt, indem man 5 ccm n/10 Jodlösung mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Man kann sie auch herstellen, indem man 5 ccm n/10 HCl mit 1 ccm 2proz. Kaliumjodatlösung und 1 g JK mischt und mit abgekochtem, destilliertem Wasser auf 100 ccm auffüllt.

Zusammenfassung.

Zur bequemeren Anleitung für die praktische Ausführung meiner Methode fasse ich das ganze Verfahren noch einmal zusammen.

Die Probe wird am besten in fein verteiltem Zustande in einen 300-ccm-Kjeldahlkolben gebracht und mit 20 bis 22 ccm konzentrierter Schwefelsäure übergossen. (Was Harn und Nahrungsmittel betrifft, so wird auf die vorangehende Darstellung verwiesen.) Das Gemisch wird vorsichtig über einem Mikrobrenner bis zur beginnenden schwachen Verkohlung erwärmt, worauf man anfängt, tropfenweise Salpetersäure aus einem geeigneten Behälter (s. Abb. 1) zuzufügen. Wenn alles gelöst ist und die Flüssigkeit sich geklärt und gelb gefärbt hat, hört die Salpetersäurezufuhr auf und der Kolben wird stärker erwärmt. Nimmt die Flüssigkeit jetzt eine dunklere Färbung an, fährt man mit dem Salpetersäurezusatz fort, nachdem man den Brenner niedergeschraubt hat. Fast immer entfärbt sich der Inhalt nach einigen Tropfen Salpetersäure, worauf man den Kolben wieder erhitzt, bis weiße Schwefelsäuredämpfe zu entweichen anfangen. Eventuell muß der Salpetersäurezusatz mehrmals wiederholt werden. Für Tapeten braucht man im allgemeinen nur ein paar Kubikzentimeter Salpetersäure zur vollständigen Verbrennung. Teppiche erfordern oft 50 bis

100 ccm. Das verbrauchte Volumen Salpetersäure wird notiert. Nun wird der Brenner entfernt und man läßt den Kolben sich abkühlen. 50 ccm destilliertes Wassers werden zugesetzt, was im allgemeinen eine Entwicklung von braunen nitrosen Gasen zur Folge hat (entgegengesetztenfalls muß man argwöhnen, daß die Verbrennung unvollständig gewesen ist). Der Kolben wird von neuem erwärmt, bis das Wasser verdampft ist. Da häufig dabei ein Stoßen auftritt, soll man ein paar Kochsteine zusetzen. Wenn weißer Schwefelsäuredampf auftritt, notiert man die Zeit, und die Erwärmung wird noch 15 Minuten fortgesetzt, um die letzten Spuren eventuell vorhandener Salpetersäure zu vertreiben. (Ist die Verbrennung unvollständig gewesen, so bekommt der Inhalt des Kolbens hierbei eine dunklere Farbe, und die Prozedur des Salpetersäurezusatzes usw. muß dann wiederholt werden.) Die Verbrennung ist jetzt fertig. Der Inhalt des Kolbens ist dann entweder farblos (oder in der Wärme schwach gelb gefärbt). Sind anorganische Farbstoffe vorhanden, kann der Inhalt auch stärker gefärbt sein. In der Regel tritt keine Fällung ein; sie kann aber vorkommen, wenn anorganische Basen zugegen sind. Harn gibt in der Regel keine Fällung.

Wenn der Kolben abgekühlt ist, werden 30 ccm destilliertes Wassers[1]) zugesetzt. Unterdessen hat man 20 g KCl abgewogen und die Vorlage in Ordnung gebracht. In den Freseniuskolben füllt man 30 ccm 20proz. Natronlauge, 100 ccm Wasser und 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung. Der Freseniuskolben wird mit dem Destillationsapparat verbunden und in eine Schale mit kaltem Wasser gesetzt. In den Kjeldahlkolben wird nun ein weithalsiger Trichter gesetzt und dadurch ein Teelöffel Mohrs Salz in den Kolben eingeführt, der darauf unter der Wasserleitung abgekühlt wird. Nach weiterem Zusatz eines Teelöffels KBr zu der vollständig abgekühlten Flüssigkeit wird das Kaliumchlorid in den Kolben geschüttet, der dann ohne Umschütteln mit dem Destillationsapparat verbunden wird. Ein kräftiger Bunsenbrenner wird unter den Kolben gestellt und die Destillation beginnt unter starker Gasentwicklung. Im allgemeinen entweicht anfangs ein Teil Salzsäuregas durch das Seitenrohr des Freseniuskolbens, ohne von der Lauge absorbiert zu werden. Dies bedeutet jedoch nichts, da alles Arsen in der Vorlage zurückbleibt. Nach Verlauf einiger Minuten geht die Destillation in ruhigem Tempo vor sich, und gleichzeitig geht die Salzsäure in Wasserlösung über. Der Inhalt des Freseniuskolbens nimmt nun eine schwach rote Farbe an, die

---

[1]) Um sich zu vergewissern, daß die Verbrennung vollständig ist, kann man jetzt einen kleinen Permanganatkristall in die Flüssigkeit werfen, die dabei eine violette Farbe annimmt. Im allgemeinen ist diese Vorsichtsmaßregel indessen überflüssig.

röter und röter wird. Schließlich tritt plötzliche Entfärbung ein. Damit ist die Destillation beendet. Der Freseniuskolben wird entfernt. Ein Teelöffel Natriumbicarbonat wird zugesetzt. Da der Kolben von der Destillation etwas erwärmt ist, muß er vor der Titrierung auf Zimmertemperatur abgekühlt werden. Dann werden etwa 50 ccm Wasser zugesetzt. Mit der Spritzflasche wird der eventuelle Inhalt des Seitenrohres hinabgespült. 10 Tropfen Stärkelösung und ein Jodkaliumkristall werden zugesetzt, worauf man mit n/200 Jodlösung titriert, bis Blaufärbung eintritt.

Die praktische Verwendung der Methode.

1. Bestimmung von reinen Arseniklösungen.

Bekannte Mengen Arseniklösung wurden in den Kjeldahlkolben abpipettiert und hiernach Schwefelsäurezusatz mit Permanganat oxydiert, worauf das Arsen mit Mohrs Salz reduziert wurde. Nach der Destillation wurde das Arsen in der Vorlage durch Titrieren bestimmt.

Tabelle III.

Zugesetzt Arsen in mg	0,02	0,02	0,04	0,04	0,075	0,075	0,110	0,110	0,190
Gefunden „ „ „	0,02	0,02	0,04	0,04	0,070	0,080	0,110	0,110	0,180

Zugesetzt Arsen in mg	0,190	0,375	0,375	1,130	1,130	1,880	1,880	3,75	3,75
Gefunden „ „ „	0,180	0,370	0,370	1,110	1,120	1,88	1,88	3,74	3,74

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung überall zufriedenstellend, indem die Fehlergrenze weit innerhalb der offiziell zugelassenen (0,05 mg) liegt. Alle diese Analysen wurden mit Chlorkaliumpräparaten ausgeführt, die genügend Bromkalium enthielten (Kahlbaums Präparat).

2. Gegenstände, mit Arsenlösung in bekannter Menge und Konzentration imprägniert.

Die Arseniklösung war bis zu 10 Proz. mit Gummi versetzt. Nachdem das Filtrierpapier usw. mit der Arsenlösung getränkt war, was direkt aus einer Bürette geschah, wurde es zunächst zum Trocknen aufgehängt. Wenn alles Wasser verdunstet war, wurde die Probe in kleine Stücke zerschnitten und in den Kjeldahlkolben gebracht.

Wie man sieht, ist auch hier die Übereinstimmung gut. Die Verbrennung des Filtrierpapiers ging bei Anwendung von Schwefelsäure allein etwas langsam vor sich. Obwohl im Anfang starke Verkohlung eintrat, veranlaßte dieser Umstand keinen Verlust an Arsen. Wurde Salpetersäure zugesetzt (5 bis 10 Tropfen) so erfolgte die Verbrennung weit schneller und war im Laufe von wenigen Minuten beendet. Dasselbe war der Fall bei der Verbrennung von gewöhnlichen Tapeten. Dicke Teppiche erforderten dagegen sehr viel längere Zeit.

Tabelle IVa.

Filtrierpapier, mit 10 Proz. Gummi enthaltender Arseniklösung getränkt.

Gewicht des Papiers g	Arsengehalt zugesetzt mg	Arsengehalt gefunden mg	Gewicht des Papiers g	Arsengehalt zugesetzt mg	Arsengehalt gefunden mg
0,77*	0,11	0,11	2 × 0,77	0,375	0,38
0,77*	0,19	0,19	2 × 0,77	0,375	0,375
0,77*	0,20	0,19	2 × 0,77	0,375	0,36
0,77*	0,375	0,36	2 × 0,77	0,375	0,38
0,77*	0,375	0,375	2 × 0,77	0,375	0,38
2,55*	0,375	0,36	3 × 0,77	0,375	0,375
2,55*	0,375	0,375	3 × 0,77	0,375	0,38
0,77*	0,75	0,72	3 × 0,77	0,375	0,38
2,55*	0,75	0,71	3 × 0,77	0,375	0,37
2,55	0,76	0,72	4 × 0,77	0,375	0,37
2,55	1,13	1,11	4 × 0,77	0,375	0,36
0,77*	1,50	1,48	4 × 0,77	0,375	0,37
2,55*	1,50	1,48	4 × 0,77	0,375	0,375
0,77	0,375	0,37	4 × 0,77	0,375	0,37
0,77	0,375	0,37	4 × 0,77	0,375	0,38
0,77	0,375	0,37			
0,77	0,375	0,37			

Die mit * bezeichneten Proben sind nur mit konzentrierter Schwefelsäure verbrannt, die übrigen mit konzentrierter Schwefelsäure und konzentrierter Salpetersäure.

Tabelle IVb.

Verschiedene mit Arseniklösung getränkte Proben.

Probe	Gewicht g	Arsengehalt zugesetzt mg	Arsengehalt gefunden mg
Tapete (200 qcm)	2,35	—	0,03
	2,35	—	0,04
	2,35	0,375	0,39
Tapete (200 qcm)	2,35	—	0,02
	2,35	—	0,02
	2,35	0,375	0,38
Wollfilz (50 qcm)	2,5	—	0,03
	2,5	—	0,03
	2,5	0,375	0,40

Was die Analysen von Arsen in Harn, Vegetabilien und animalischen Nahrungsstoffen betrifft, sei auf eine Abhandlung, die später in dieser Zeitschrift publiziert werden wird, verwiesen.

Über das Reduktions- und Jodbindungsvermögen des Harns.

I. Mitteilung:

Untersuchungen am Normalen.

Von

H. K. Barrenscheen und L. Popper.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 16. Juni 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In einer Reihe von Mitteilungen hat *Wm. O. Moor*[1]) die Existenz eines neben dem Harnstoff normalerweise vorkommenden, von ihm U-Stoff bezeichneten Körpers behauptet, der, bei gleicher elementarer Zusammensetzung vom Harnstoff durch Kristallisation, Reaktion usw. grundverschieden sein sollte.

Zur Darstellung dieses U-Stoffes dampft *Moor* den Harn zunächst im Vakuum bei 50° ein, extrahiert mit absolutem Alkohol, verjagt den Alkohol im Vakuum bei 40 bis 42°, trocknet, nimmt wiederholt mit Alkoholäther auf und fällt schließlich den U-Stoff aus alkoholischer Lösung mit Äther im Überschuß. Der Grund, warum dieser in normalen Harnen den Harnstoff angeblich an Menge übertreffende Körper bisher nicht aufgefunden wurde, sollte in der Labilität dieses Stoffes gelegen sein, der sich mit größter Leichtigkeit in Harnstoff umlagert. Dieser U-Stoff sollte auch der Träger des Reduktionsvermögens (R. V.) des Harns gegen eine Lösung von Ferriferricyankalium sowie gegen Phosphorwolframsäure bei ammoniakalischer Reaktion sein. Auch die Desoxydationskraft des Harns, d. h. die Fähigkeit, große Mengen von Permanganatlösung zu reduzieren, sollte an diesen U-Stoff gebunden sein, der sich in eine saure und basische Fraktion zerlegen ließ und der Träger der normalen Harnacidität sein soll.

Wenn auch dieser U-Stoff vielfach weitgehende Ähnlichkeiten mit dem von *Moor* vor rund 20 Jahren[2]) beschriebenen Urein aufwies, das durch die einwandfreien Untersuchungen von *F. Lippich*[3]) endgültig erledigt schien, haben wir trotzdem eine Nachprüfung der *Moor*schen Angaben unternommen. Schien ja durch die Untersuchungen

---

[1]) Diese Zeitschr. **143**, 423, 1923; **149**, 573, 1924; **153**, 19, 1924; **154**, 486, 1925.

[2]) Zeitschr. f. Biol. **44**, 121, 1904; **45**, 420, 1904.

[3]) H.-S. **48**, 160, 1906; **52**, 219, 1907.

Edlbachers[1]) das Vorkommen von Harnstoff in irgend einer nicht näher zu definierenden Bindung nicht ausgeschlossen zu sein. Wir haben uns bei unseren Nachprüfungen, die wir mit Harnen normaler kräftiger junger Leute durchgeführt haben, im wesentlichen an die *Moor*schen Vorschriften gehalten mit einem Unterschied, daß die letzte Alkohol-Ätherextraktion nicht im Kolben bei 30° abdestilliert, sondern in flachen Glasschalen im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur zur Trockne gebracht wurde.

In allen untersuchten Fällen konnten wir nur kristallisierten Harnstoff neben amorphem Farbstoff erhalten. Dieser Farbstoff, dessen Menge von der Färbung des Ausgangsharnes abhing, bedingt die Hygroskopizität des Abdampfrückstandes und ist, entgegen den *Moor*schen Behauptungen, auch Träger des Reduktionsvermögens und der sauren Reaktion dieser Extrakte. Von der Existenz eines U-Stoffes, der sich in kristallisierten Harnstoff umlagern soll, kann nach unseren Untersuchungen keine Rede sein. Merkwürdigerweise unterscheidet sich die Darstellung des Urochroms nach *Moor* in keiner Weise von der Darstellung des U-Stoffes, außer man würde in der Anwendung von Methyl- statt Äthylalkohol einen fundamentalen Unterschied suchen. Wir verzichten aus Gründen der Raumersparnis auf eine nähere Wiedergabe unserer diesbezüglichen Protokolle und möchten uns eingehender nur mit dem Reduktionsvermögen des normalen Harns beschäftigen.

I.

Auf die Desoxydationskraft des Harns, d. h. auf die Zerstörung von Permanganat bei der normalen Reaktion des Harns, wollen wir hier nicht näher eingehen. Bei einem so zusammengesetzten Milieu, wie es der Harn vorstellt, liegen die Verhältnisse viel zu kompliziert, als daß über die dabei sich abspielenden Vorgänge eine einwandfreie Aussage möglich wäre. Gegenüber *Moor* stellen wir nur fest, daß, bei Prüfung der Desoxydationskraft des alkoholischen Extraktes und des Rückstandes, im Extrakt nur ein Drittel der ursprünglich vorhandenen nachweisbar ist, während der Rest sich im Rückstand vorfindet.

Was die Reduktion von Phosphorwolframsäure bei ammoniakalischer Reaktion anlangt, so müssen wir den Angaben *Moors* auch in ihrer letzten Fassung[2]) auf das entschiedenste widersprechen. Fällt man aus einem Harn bei salzsaurer Reaktion durch Phosphorwolframsäure die Harnsäure und mit ihr die überwiegende Menge der Farbstoffe aus, so erhält man in dem Filtrat bei nachträglichem Versetzen mit Ammoniak nur eine minimale, durch Reduktion der Wolframsäure hervorgerufene Blaufärbung.

---

[1]) H.-S. **120**, 71, 1922.
[2]) Diese Zeitschr. **154**, 486, 1925.

Anders verhält es sich mit der Reduktion einer Lösung von Ferricyankalium-Ferrichlorid durch den normalen Harn. Hier können wir die tatsächlichen Angaben von *Moor* teilweise bestätigen, sind jedoch, was deren Deutung anlangt, auf Grund unserer Befunde zur entgegengesetzten Ansicht gekommen.

Versetzt man normalen Harn mit dem doppelten Volumen einer frisch bereiteten Lösung aus gleichen Teilen m/10 $FeCl_3$ und $K_3Fe(CN)_6$, so tritt augenblicklich Blaugrünfärbung auf, die von einer anfangs fein-, in wenigen Minuten grobflockigen Fällung von Berlinerblau gefolgt wird. Diese Fällung ist so massig, daß wir die Höhe des Niederschlags anfänglich zur Messung der Reduktionskraft des normalen Harns benutzten. Das R. V. wird weder durch Kochen noch durch Zusatz von konzentrierter Salzsäure geändert. Bei den zahlreichen Untersuchungen darüber war uns ein unverkennbares Parallelgehen der Stärke der Reaktion mit der Harnfarbe aufgefallen[1]). Es war naheliegend, das R. V. entgegen *Moor* mit der Ausscheidung der normalen Harnfarbstoffe in Verbindung zu bringen, und wir suchten zunächst durch eine quantitative Bestimmung der Harnfarbe und des R. V. uns darüber Klarheit zu verschaffen.

Zum Vergleich der Harnfarbe verwendeten wir eine 0,01 proz. Lösung von Bismarckbraun, der auf je 100 ccm 0,1 ccm einer gesättigten wässerigen Pikrinsäurelösung zugesetzt wurde. Eine so hergestellte Lösung erlaubt im *Autenrieth*schen Kolorimeter eine befriedigende Vergleichung normaler Harne, die je nach der Intensität der Färbung auf das Doppelte bis Dreifache verdünnt werden müssen. Die Angaben *Roessinghs*[2]), der zur kolorimetrischen Vergleichung der Harnfarbe eine 0,1- bis 0,2 proz. Bismarckbraunlösung verwendet haben will, dürften auf einem Druckfehler beruhen. Das uns zur Verfügung stehende reine Bismarckbraun erwies sich in diesen Konzentrationen als fast zehnfach zu stark gefärbt. Der Zusatz der Pikrinsäure gestattet, die Kolorimetrie viel exakter durchzuführen, weil durch sie die mehr ins Rotbraun gehende Färbung des Bismarckbrauns kompensiert wird.

Zum Vergleich der Reduktionskraft verwendeten wir anfangs die Höhe des Niederschlages, der nach einstündigem Stehen bei Luftabschluß 5 Minuten lang in hämatokritähnlichen Röhrchen zentrifugiert wurde. Die Methode erwies sich als zu grob und von physikalischen Bedingungen zu sehr abhängig. Auch der Versuch einer kolorimetrischen Bestimmung führte wegen der rasch einsetzenden Flockung zu keinem verwertbaren Ergebnis. Schließlich fanden wir einen brauchbaren Weg

---

[1]) *Moor* verlangt für die Darstellung des U-Stoffs nur *kräftig* gefärbte Harne!

[2]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **42**, 1924.

in einer Verdünnungsmethode, bei welcher zu absteigenden Verdünnungen des Harns — wir verwendeten je 5 ccm — 1 ccm einer frisch bereiteten m/250 Lösung von $FeFe(CN)_6$ zugesetzt und die Grenze der Blaufärbung bestimmt wurde. Die Bestimmungen wurden durchweg im Dunkelzimmer bei künstlichem Licht ausgeführt und durch rasches Verkorken der Reagenzröhrchen der Luftzutritt tunlichst vermieden. Als Reduktionswert bezeichnen wir diejenige Verdünnung des Harns, bei welcher Blaufärbung noch nachweisbar ist. Beim Normalen liegen diese Werte innerhalb weiter Grenzen, zwischen 600 und 24000, je nach Konzentration und Färbung des Harns, ohne jedoch eine strenge Gebundenheit mit dem spezifischen Gewicht zu zeigen. Wieweit Reduktionsvermögen und Färbung miteinander parallel gehen, ist aus folgender Zusammenstellung eines Bruchteiles unseres Materials sowie aus den Tageskurven (s. Kurve 1 und 2) zu ersehen.

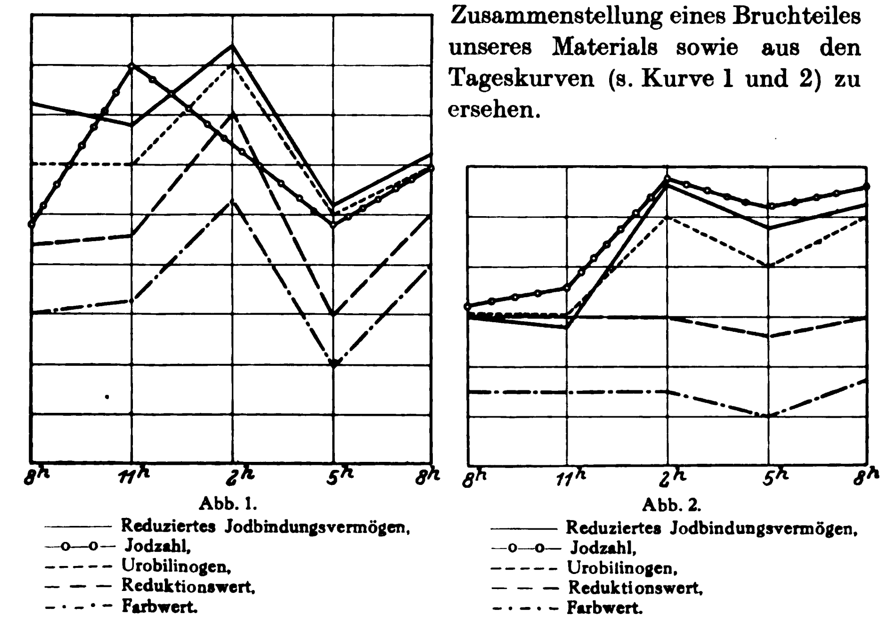


Abb. 1.

——— Reduziertes Jodbindungsvermögen,
—o—o— Jodzahl,
- - - - - Urobilinogen,
— — — Reduktionswert,
- · - · - Farbwert.

Abb. 2.

——— Reduziertes Jodbindungsvermögen,
—o—o— Jodzahl,
- - - - - Urobilinogen,
— — — Reduktionswert,
- · - · - Farbwert.

Tabelle I.

Name	Spez. Gew.	Farbe *)	Reduktionswert	Name	Spez. Gew.	Farbe	Reduktionswert
Eis. . .	1032	2	12000 ±	*Po.* . .	1025	94	800
Bri. . .	1030	5	12000 ±	*Pop.* .	1025	100	800
Po. . .	1030	26	6000	*Deutsch.*	1024	65	3200
Eis. . .	1030	35	6000	*Po.* . .	1023	75	3200 ±
Mo. . .	1030	78	1600	*Ba.* . .	1017	73	3200 ±
Stras. .	1028	55 (3fach verd.)	24000	*Mo.* . .	1013	100	800 ±
Po. . .	1028	45	6000	*Buch.* .	1010	80	1600

*) Farbe ausgedrückt in Skalenteilen des großen *Autenrieth*schen Kolorimeters. Wo nicht ausdrücklich vermerkt, ist die Farbe auf den doppelt verdünnten Harn bezogen. Die Werte sind nach absteigendem spezifischen Gewicht geordnet.

War der Zusammenhang des Reduktionswertes mit der Harnfarbe schon durch die quantitative Schätzung beider gegeben, so können wir für unsere Auffassung noch weitere Gründe anführen. Bei der Extraktion des Harnstoffs nach *Moor* geht ebenso wie bei seiner Darstellung des Urochroms, die nur durch die Verwendung von Methylalkohol an Stelle von Äthylalkohol unterschieden ist, durchaus nicht aller Farbstoff in den Extrakt. Löst man den alkoholunlöslichen Rückstand wieder in Wasser, so zeigt er ebenso wie der alkoholische Auszug ein seiner Färbung entsprechendes Reduktionsvermögen, das etwa ein Viertel des ursprünglichen beträgt. Das Urochrom *Moors*, das keineswegs nur die Farbstoffe enthält, zeigt ebenso wie das nach *Garrod* dargestellte Urochrom intensivstes R. V. Das gleiche Verhalten bietet der nach *Hans Fischer* und *Zerweck*[1]) durch Dialyse des im Vakuum eingeengten Harns gewonnenen Farbstoff.

Qualitativ enthält das *Moor*sche Urochrom analog dem Urochrom von *Garrod* und *Dombrowski* und dem *Fischer*schen Farbstoff neben N auch S. Außer $FeFe(CN)_6$, das auch *Dombrowskis* Urochrom zu Berlinerblau reduziert[2]), wird auch ammoniakalische Silberlösung reduziert. Der bei der Isolierung des Harnstoffs mitgefällte Farbstoff, den wir als den Träger des R. V. ansehen müssen, zeigt die von *Moor* dem U-Stoff zugeschriebene saure Reaktion. Die saure Natur kommt übrigens auch dem *Garrod*schen und *Dombrowski*schen Urochrom zu. Bestimmt man in dem alkoholunlöslichen Rückstand und im Alkoholextrakt die Titrationsacidität, so zeigt sich, daß nur 40 bis 50 Proz. der Totalacidität im alkoholischen Extrakt zu finden sind.

Für die Rolle des Farbstoffs beim Zustandekommen der Reduktion spricht auch das vollkommene Verschwinden des R. V., wenn man die Harnfarbstoffe mit neutralem und basischem Bleiacetat niederschlägt. Zerlegt man den Niederschlag mit verdünnter Schwefelsäure, so zeigt sich in der schwefelsauren Lösung der Farbstoffe neuerlich das R. V. Gleiches gilt für den Phosphorwolframsäureniederschlag. Auch durch Tierkohle entfärbter Harn läßt jedes R.V. vermissen. Ob der Reduktionswert entsprechend den Anschauungen *Dombrowskis* und *Fischers* über die Natur des Harnfarbstoffes uns einen Ausdruck für den Ablauf des Eiweißstoffwechsels abgeben kann, müssen Untersuchungen an pathologischem Material zeigen.

II.

Das Verhalten des R.V. und seine Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration legte es nahe, an einen Zusammenhang zwischen ihm und dem zuletzt von *Weltmann*[3]) näher untersuchten Jodbindungsvermögen

[1]) H.-S. **137**, 176, 1924.
[2]) H.-S. **46**, 83, 1905.
[3]) Wien. Arch. f. inn. Med. **2**, 107, 1920.

zu denken. Soll doch nach *Weltmann* das Jodbindungsvermögen in Beziehung zu den Farbstoffen und Chromogenen stehen. Vergleichende Bestimmungen des Jodbindungs- und Reduktionsvermögens an zahlreichen normalen Harnen zeigten uns jedoch, daß der erwartete Parallelismus durchaus nicht in allen Fällen eintraf. Im großen und ganzen können wir die Angaben *Weltmanns* über das Parallelgehen des Jodbindungsvermögens mit dem spezifischen Gewicht der Harne bestätigen. Die Reduktionswerte gehen jedoch diesen beiden Größen durchaus nicht immer parallel, vielmehr erhielten wir oft derartige Divergenzen, daß die in einzelnen Fällen beobachtete Übereinstimmung zwischen R.V. und Jodwert eine zufällig bedingte sein mußte. Das Auseinandergehen der beiden Werte zeigt sich besonders deutlich bei Anlegung einer Tageskurve, wie wir sie im nachstehenden bringen. Daß tatsächlich R.V. und Jodbildung im Harn miteinander nichts zu tun haben, konnten wir auf anderem Wege erweisen. Bestimmt man in einem Harn das Jodbindungsvermögen und macht man nun mit diesem mit Jod gleichsam gesättigten Harn und mit dem ursprünglichen Harn eine Bestimmung des Reduktionsvermögens, so zeigt sich, daß dieses in beiden Fällen das gleiche ist. Die Absättigung der jodbindenden Substanz hat also auf den Ausfall des R.V. nicht den geringsten Einfluß. Einen weiteren Beweis für die Verschiedenheit der beiden Reaktionen gab uns die Verfolgung einer mündlich mitgeteilten Beobachtung *Weltmanns*, daß ein Teil des Jodbindungsvermögens nach Zusatz des halben Volumens Eisessig zum Harn verloren geht. Diese Beobachtung können wir bestätigen und dahin erweitern, daß außer Eisessig auch Weinsäure in entsprechender Konzentration die gleichen Ergebnisse zeitigt. Durch sie konnten wir auf anderem Wege den Beweis erbringen, daß wir es beim Jodbindungsvermögen und beim R.V. des Harns mit zwei scharf zu trennenden Reaktionen zu tun haben, deren Substrat ein durchaus verschiedenes sein muß. Während Eisessigzusatz das Jodbindungsvermögen nach unseren Untersuchungen auf 9 bis 29 Proz. des Ausgangswertes herabdrückt, wird das R.V. durch den Säurezusatz in keiner Weise beeinflußt. Diese Beobachtung zeigt aber auch, daß das Jodbindungsvermögen in seinem überwiegenden Anteil mit den Farbstoffen des Harns nichts zu tun hat, vielmehr dürfte es sich dabei um eine physikalisch-chemische Adsorption des Jods an die normalen Harnkolloide handeln. Der Säurezusatz würde nach unserer Auffassung das kolloide Milieu so weit ändern, daß nun eine Adsorption unmöglich wird und nur das Jod aufgenommen wird, das in wahrer chemischer Bindung in Reaktion tritt.

III.

Wenn wir von der Auffassung ausgehen, daß das Jodbindungsvermögen in seinem wesentlichen Teil einen physikalisch-chemischen

Vorgang darstellt, so mußten wir uns die Frage vorlegen, wodurch das nach Eisessigzusatz bestehen bleibende Jodbindungsvermögen bedingt sei. Wir wollen diesen Teil des Jodbindungsvermögens kurz als reduziertes Jodbindungsvermögen (r. J. b. V.) bezeichnen und dafür dieselbe Berechnung zugrunde legen, wie sie *Weltmann* für seine Jodzahl angibt. Wir bezeichnen als r. J. b. V. die Anzahl Kubikzentimeter einer n/20 Jodlösung, welche von 100 ccm Harn nach Versetzen mit 50 ccm Eisessig gebunden werden. Da bei den geringen Werten des r. J. b. V. sich bei Verwendung der n/20 Jodlösung leicht große Fehler ergeben können, haben wir die Bestimmung mit einer n/50 Jod- bzw. Thiosulfatlösung ausgeführt, die frisch aus einer genau gestellten n/10 Lösung hergestellt wurden. Titriert wurde mit einer *Pregl*schen Mikrobürette. Der Jodzusatz betrug 5 ccm n/50 Jodlösung auf 10 ccm mit dem halben Volumen Eisessig versetzten Harn. Die Rücktitration wurde unmittelbar nach dem Zusatz vorgenommen, die Werte auf n/20 Lösung und 100 ccm Harn umgerechnet. Wir haben uns zu dieser Umrechnung entschlossen, um einen Vergleich mit den *Weltmann*schen Jodzahlen zu haben. Zunächst konnten wir feststellen, daß die Höhe des r. J. b. V. durchaus nicht mit der Jodzahl parallel geht. Hohe Jodzahlen zeigen oft ein niedriges r. J. b. V., und umgekehrt finden wir relativ hohes r. J. b. V. bei niedriger Jodzahl. Die Unabhängigkeit des r. J. b. V. von der Jodzahl zeigt sich am schönsten bei Beobachtung einer Tageskurve, wie sie in Kurve 1 wiedergegeben ist.

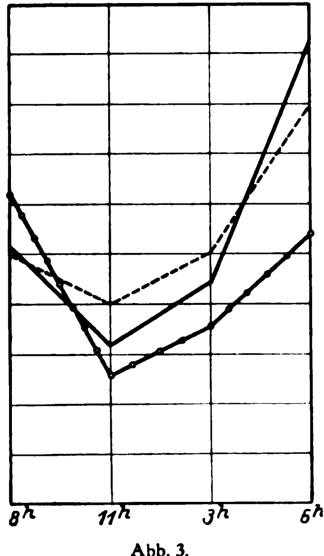


Abb. 3.
Jodzahl, reduziertes Jodbindungsvermögen und Urobilinogen.
Zeichenerklärung s. Abb. 1 u. 2.

Die Verfolgung der Tagesschwankungen zeigt aber auch einen ganz eigentümlichen Verlauf der Kurve für das r. J. b. V. Wir finden ihren tiefsten Punkt am Vormittag, ihre höchste Erhebung nachmittags, wobei der Einfluß der Mahlzeit unverkennbar ist. Relativ hohe Werte zeigt auch der konzentrierte Morgenharn. Diese Form der Kurve und die Abhängigkeit von der Mahlzeit legte unwillkürlich den Vergleich mit der Ausscheidung des Urobilinogens nahe. Aus diesem Grunde haben wir Bestimmungen beider nebeneinander ausgeführt — das Urobilinogen wurde nach der Verdünnungsmethode bestimmt — und können auf Grund einer größeren Anzahl von Versuchen beim Normalen ein absolutes Parallelgehen beider Kurven miteinander feststellen

Tabelle II.

Name	Zeit	Spez. Gew.	Jodzahl	Reduziertes Jodbindungsvermögen	Urobilinogen, in welcher Verdünnung positiv?
Po. . .	12ª	1022	18	2	2fach
	2ᵖ	1022	13	2,2	2 "
	4	1022	24	2,7	4 "
Sim. . .	10ª	1014	13,8	2,4	2 "
	4ᵖ	1022	31,2	4,0	8 "
	5	1022	19,6	4,0	16 " ?
Ros. . .	11ª	1028	17,0	2,4	2 "
	4ᵖ	1030	31	4,2	8 "
Hochm. .	7ª	1029	31	2,4	4 " ?
	11	1021	13	1,6	2 "
	2ᵖ	1027	18	2,2	4 " ?
	5	1030	27	4,6	8 "
Eisl. . .	8ª	1027	21	3,4	4 "
	10	1023	22	2,6	2 "
	1ᵖ	1027	24	3,2	4 " ?
	3	—	22	3,6	4 "
	5	—	30	3,7	4 "
Buchb. .	8ª	—	12	3,6	4 "
	11	—	20	3,4	4 "
	3ᵖ	—	16	4,2	8 "
	5	—	12	2,6	4 " ?
	8	—	17	3,1	4 "

(s. Kurve 1 bis 3 und Tabelle II). Es hat den Anschein, als ob das r. J. b. V. uns einen objektiven, zahlenmäßigen Aufschluß über die Urobilinogenausscheidung verschaffen könnte. Im Gang befindliche Untersuchungen an pathologischen Fällen sollen darüber weiteren Aufschluß geben und gleichzeitig die Frage beantworten, ob das Urobilinogen allein dieses r. J. b. V. bedingt oder ob daran noch andere, bisher nicht in den Kreis der Untersuchungen gezogene Harnbestandteile beteiligt sind, deren Ausscheidung mit der des Urobilinogens gekoppelt ist[1]). Diese Untersuchungen werden auch aufzuklären haben, wieweit Reduktionsvermögen und reduziertes Jodbindungsvermögen klinisch verwertbare Zahlen darstellen.

Zusammenfassung.

1. Ein U-Stoff im Sinne *Moors* existiert nicht, vielmehr sind alle dem U-Stoff zugeschriebenen Eigenschaften durch die mitgeteilten Farbstoffe bedingt[2]).

---

[1]) Wir sehen selbstverständlich hier vom Bilirubin ab, das bekanntlich auch Jod bindet.

[2]) Wir vermeiden absichtlich, uns durch die Bezeichnung Urochrom in irgend einer Weise festzulegen.

2. Das Reduktionsvermögen des normalen Harns ist durch seinen Farbstoffgehalt bedingt und geht demselben streng parallel. Der Reduktionswert eines Harns zeigt sich vom spezifischen Gewicht und dem Jodbindungsvermögen unabhängig.

3. Durch Eisessigzusatz wird das Jodbindungsvermögen auf 9 bis 29 Proz. seines ursprünglichen Wertes herabgesetzt, das Reduktionsvermögen bleibt unbeeinflußt.

4. Das durch Eisessig reduzierte Jodbindungsvermögen zeigt in seiner Tageskurve einen durchgehenden Parallelismus mit der Ausscheidungskurve des Urobilinogens und könnte vielleicht als objektiver zahlenmäßiger Ausdruck der Urobilinogenausscheidung herangezogen werden.

Beiträge zur Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe.

Von

Robert O. Loebel [New-York][1]).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. Juni 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Die Zusammenhänge, die zwischen der Atmung und der Milchsäurebildung in den tierischen Organen bestehen, sind zunächst im Muskel genauer erforscht worden. Die Atmung dient hier dazu, die freiwillige Spaltung des Glykogens in Milchsäure rückgängig zu machen. Dies geschieht im Anschluß an die anaerobe Anhäufung der Milchsäure durch analytisch nachweisbare Rückverwandlung in Kohlehydrat, ebenso auch im Falle des äußeren Zusatzes von Milchsäure zum Muskel, die hierbei, wie neuerdings gezeigt wurde, auch durch Brenztraubensäure ersetzt werden kann[2]). Daß aber derselbe Prozeß dauernd in der Ruheatmung abläuft, kann aus dem Verhältnis der durch den Sauerstoff am Auftreten verhinderten Milchsäure zum verbrauchten Sauerstoff gefolgert werden. Neben dieser Verknüpfung besteht im Muskel noch eine andere: Die Konzentration der Milchsäure reguliert die Atmungsgröße des Muskels; wir dürfen annehmen, daß die Größe der Ruheatmung wesentlich von der in jedem Zeitdifferential durch spontanen Zerfall entstandenen Milchsäuremenge abhängt und im intakten Muskel gerade ausreicht, um diese vollständig zum Verschwinden zu bringen.

Otto Warburg und seine Mitarbeiter[3]) haben nachgewiesen, daß die Glykolyse, die die verschiedenen Warmblüterorgane in Gegenwart von Zucker zeigen, mit derjenigen im Muskel in manchen Punkten Ähnlichkeit hat; vor allem hat die Atmung zahlenmäßig denselben Einfluß auf diese Glykolyse wie auf den Spaltungsumsatz im Muskel: das Verhältnis der in der Atmung verschwindenden Milchsäure zum

---

[1]) Fellow National Research Council U. S.

[2]) *O. Meyerhof, K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1924.

[3]) *O. Warburg, Posener* und *Negelein*, ebendaselbst **152**, 309, 1924.

aufgewandten Sauerstoff ist das gleiche. Trotzdem ist es zunächst nicht erwiesen, daß sich hier in der Atmung der gleiche Kreislauf des Kohlehydrats vollzieht. Auch weist die von *Warburg* speziell am Carcinom studierte Glykolyse gegenüber der im Muskel eine Reihe wichtiger Unterschiede auf: sie wird durch Narcotica in ähnlichem Maße wie die Atmung gehemmt[1]), während die Milchsäurebildung im Muskel dadurch eher beschleunigt wird[2]). Die Milchsäurebildung aus Fructose ist im Carcinom nur ein Zehntel so stark wie aus Glucose; im Muskel dagegen besteht zwischen Fructose und Glucose nach *O. Meyerhof* sowie *F. Laquer* und *P. Meyer*[3]) kein bedeutender Unterschied. Bei höheren Temperaturen erweist sich nach den letzteren Forschern das Glykogen noch erheblich überlegen über die Hexosen, was ebenfalls im Carcinom nicht der Fall ist[4]).

Ich habe deshalb auf Vorschlag und unter Anleitung von Herrn *Meyerhof* untersucht, ob die Glykolyse in normalen Kalt- und Warmblüterorganen in ihrer Empfindlichkeit gegen Narcotica und in ihrer Abhängigkeit von der Natur des gespaltenen Zuckers dem Typus des Carcinoms oder dem des quergestreiften Muskels entspricht. Gleichzeitig wurde der Einfluß der verschiedenen Zucker, der Milchsäure und Brenztraubensäure auf die Atmung studiert, um Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, ob hier ähnlich wie im Muskel die Milchsäure in der Atmung wieder in Kohlehydrat zurückverwandelt wird. Hiermit hängt weiter das Problem zusammen, ob die durch die Spaltung des Zuckers entstandene Milchsäure überhaupt oxydiert werden kann und nicht vielmehr in toto zurückverwandelt wird, während dabei eine gewisse Kohlehydratmenge verbrennt. Ist die Milchsäure auch ein Zwischenprodukt des oxydativen Zuckerzerfalls oder lediglich des anaeroben, und verbrennt der Zucker auf einem anderen Wege?

Die Mehrzahl meiner Versuche habe ich mit der nervösen Substanz ausgeführt, und zwar am Froschrückenmark und an der grauen Hirnrinde der Ratte[5]). Zum Vergleich wurden auch Atmung und Glykolyse vom *Flexner*schen Rattencarcinom und des Hautepithels neugeborener weißer Mäuse und Ratten herangezogen. Es war nötig, Gewebe zu

---

[1]) *S. Minami*, diese Zeitschr. **142**, 334, 1923

[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Archiv **188**, 148, 1921 und unveröffentlichte Versuche.

[3]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **124**, 211, 1923.

[4]) Mündliche Mitteilung von Professor *O. Warburg*.

[5]) Die Arbeiten von *E. Hirschberg* und *H. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 185, 1917; **101**, 248, 1918, über den Zuckerstoffwechsel der nervösen Zentralorgane (Froschrückenmark) und von *Asher* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 441, 1924, über den Kohlehydratstoffwechsel des Gehirns (Warmblütergehirn in situ) haben keine direkte Beziehung zu meinen Versuchen.

benutzen, die stark glykolysieren; das ist nach *Warburg*, *Posener* und *Negelein* für die genannten Gewebe der Fall. Die graue Hirnrinde bietet obendrein den Vorteil, daß die Säurebildung in Abwesenheit von Zucker minimal ist und auch die Atmung unter diesen Umständen rasch sinkt. Die Beeinflussung der beiden Stoffwechselprozesse ist daher hieran besonders leicht zu studieren.

Methodik.

Als Methode verwandte ich die von *Warburg* und *Minami* bebeschriebene[1]), wobei als Atmungströge Gefäße von etwa 4 ccm Innenraum benutzt werden. Dieselben werden mit dem Versuchsmaterial und 0,6 ccm Lösung beschickt. Um in den Atmungsversuchen in längeren Zeiträumen ein Alkalischwerden der bicarbonathaltigen Lösung (durch Destillation der Kohlensäure in die NaOH des Einsatzes) zu verhindern, wurde das Bicarbonat in einigen Fällen durch Phosphat ersetzt. Die Ergebnisse stimmten in beiden Fällen überein. Die Bicarbonatkonzentration für die Glykolyse betrug 2,5 bis $3 \cdot 10^{-2}$ mol.; der Gasraum wurde in diesem Falle mit 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff, bzw. 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff gefüllt. Die Bicarbonatkonzentration für die Atmung betrug 3,0 bis $3,6 \cdot 10^{-3}$ mol., im Gasraum befand sich reiner Sauerstoff. Als Lösung wurde isotone Ratten- bzw. Frosch-Ringerlösung verwandt, die, wo nichts anderes vermerkt, 0,2 Proz. Glucose enthielt. Versuchstemperatur für Froschorgane 20°, für Rattenorgane 38°.

Das Froschrückenmark wurde präpariert, indem die Wirbelsäule am Ansatz des Hinterhauptes durchgetrennt und der Wirbelkanal vom Rücken her freigelegt wurde; von der angehobenen Cauda equina her wurden die Nerven beiderseits durchtrennt, die Pia wurde vorsichtig abgezogen und das herausgenommene Rückenmark in der Längsrichtung in vier möglichst gleiche Sektionen zerlegt, die in vier Gefäße verteilt wurden. Für jeden Versuch wurden in der Regel drei bis vier Rückenmarkexemplare verwandt; die Substanzmenge in jedem Gefäß besaß so etwa 5 mg Trockengewicht. Die nach der *Warburg*schen Formel berechnete kritische Schnittdicke für die Atmung des Rückenmarks beträgt 0,9 mm. Die größte Dicke der benutzten Rückenmarkstreifen war 0,5 mm. Die Substanzmenge wurde nach dem Versuch bei 100° getrocknet und auf einer *Sartorius*schen Mikrowage gewogen. Daraus wurden der Q_{O_2}-Wert für die Atmung (Kubikmillimeter Sauerstoff pro Milligramm Trockengewicht und Stunde) und der Q_{CO_2}-Wert für die Glykolyse (Kubikmillimeter Kohlensäure pro Milligramm Trockengewicht und Stunde = 0,004 mg Milchsäure) berechnet.

Von dem Rattengehirn wurden mit dem Rasiermesser flache Schnitte der oberen Konvexität gemacht, die mit Glasstäben manipuliert wurden. Ihre Grenzschnittdicke betrug 0,45 mm. Die Haut neugeborener Ratten oder Mäuse wurde mit dem Rasiermesser abgezogen unter Zurücklassung des subkutanen Gewebes. Die Innenseite wurde dann vorsichtig mit dem Rasiermesser von anhaftendem Bindegewebe befreit, so daß lediglich das Epithel verwandt wurde. Für die Versuche mit *Flexner*schem Rattencarcinom wurden mir einige geimpfte Ratten von Herrn *Warburg* überlassen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.

Am schwierigsten ist es, mit der grauen Gehirnsubstanz in verschiedenen Versuchen genau übereinstimmende Resultate zu erhalten, zur Hauptsache wegen des Gewichtsverlustes während des Versuchs und wohl auch wegen der Ungleichwertigkeit verschiedener Schnitte. Über die Größe der Schwankungen mit normalen Versuchen orientiert die folgende Tabelle (I), wo je vier Messungen der anaeroben Glykolyse an Schnitten desselben Gehirns in zuckerhaltiger Ringerlösung ohne weitere Zusätze ausgeführt sind.

Tabelle I.

Kontrollserie der anaeroben Glykolyse in der grauen Gehirnsubstanz.

Nr.	Zeit	mg Trockengewicht	Schnittdicke	Q_{CO_2}
1	1h	2,12	0,35	14,2
		2,12	0,35	14,6
		1,86	0,31	19,6
		2,68	0,45	12,1
2	30′	2,14	0,34	13,4
		2,53	0,31	14,9
		1,87	0,47	11,7
		1,63	0,33	11,9

Daß die gebildete Säure wirklich in toto Milchsäure ist, wurde durch chemische Bestimmung der Milchsäure (nach *Fürth-Charnass*) kontrolliert. Für die Ausführung dieser Kontrollen bin ich dem Assistenten der Abteilung, Herrn Dr. *Lohmann*, zu Dank verpflichtet.

I. Versuche über die narkotische Hemmung von Atmung und Glykolyse.

Das Ergebnis der Versuche mit Froschrückenmark ist für fünf typische Narcotica auf Abb. 1 dargestellt. Die gestrichelten Felder entsprechen der prozentischen Hemmung der anaeroben Glykolyse, die ganzen Felder der Atmungshemmung. Man sieht, daß die Glykolyse durch die gleiche Narcoticumkonzentration stets außerordentlich viel schwächer gehemmt ist. Doch gilt auch für diese Hemmung die Regel der homologen Reihe, und die Abstufung nach den höheren Gliedern folgt der „Strukturwirkungsstärke“ der Narcotica, so daß auch gesättigte Lösungen von Phenylurethan und Heptylalkohol hemmen. Die einzelnen Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt.

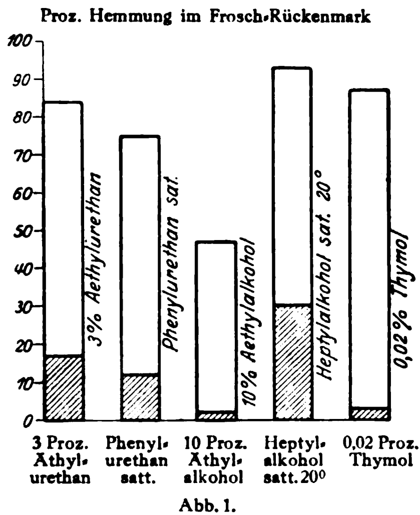


Abb. 1.
Geschwärzte Felder: Hemmung der Glykolyse.
Gesamte Felder: Hemmung der Atmung.

Im Prinzip genau gleich wie das Froschrückenmark verhalten sich die verschiedenen Rattengewebe. Auch hier wird stets die Glykolyse schwächer gehemmt als die Atmung. Dabei ist zwischen der grauen Substanz, dem wachsenden Epithel und dem Carcinom kein Unterschied. Vielleicht ist die Differenz der Wirkungsstärken für Atmung und Glykolyse bei den Warmblüterorganen etwas kleiner als bei der

Tabelle II.

Narkotische Hemmung im Froschrückenmark (Versuchsdauer 1 Stunde).

Nr.	Narcoticum	Prozentische Konzentration	Atmung		Anaerobe Glykolyse	
			Q_{O_2}	Proz. Hemmung	Q_{CO_2}	Proz. Hemmung
1	—	—	2,15	—	7,63	—
	Äthylurethan	3	0,40	81	5,67	26
2	—	—	2,77	—	6,58	—
	Äthylurethan	3	0,35	87	6,93	0
3	—	—	—	—	7,92	—
	—	3	—	—	5,99	25
	—	6	—	—	1,83	77
	—	9	—	—	0,84	90
4	—	—	1,88	—	5,57	—
	Phenylurethan	gesättigt	0,59	69	4,47	20
5	—	—	1,90	—	4,72	—
	Phenylurethan	gesättigt	0,36	81	4,53	4
6	—	—	2,23	—	5,33	—
	Äthylalkohol	10	1,17	48	5,24	2
7	—	—	—	—	6,81	—
	Heptylalkohol	gesättigt	0	100	5,46	25
8	—	—	—	—	4,37	—
	Heptylalkohol	gesättigt	0	100	4,27	2
9	—	—	—	—	4,98	—
	Heptylalkohol	gesättigt	0,50	80	2,0	60
10	—	—	2,29	—	4,93	—
	Thymol	0,01	0,84	63	7,84	0
11	—	—	1,94	—	5,92	—
	Thymol	0,02	0,25	87	6,08	0

Medulla des Frosches; hinzu kommt, daß bei 38° die in gesättigter Lösung benutzten Stoffe höher konzentriert sind als bei 20°. Vereinzelt aus der Reihe fallende Versuche müssen auf unaufgeklärte Unregelmäßigkeiten bezogen werden. In vielen Fällen ist sogar die Glykolyse bei kleinen Narcoticumkonzentrationen gesteigert, doch überschreiten die Ausschläge meistens nicht die Fehlergrenze. Als Beispiel gebe ich ein Versuchsprotokoll mit Rattenhirn und in Tabelle III eine Zusammenstellung der Resultate an Säugetiergeweben.

Versuchsprotokoll zu Versuch 1, Tabelle III.

In allen Gefäßen 0,5 ccm Ringer mit 0,2 Proz. Glucose, in den Atmungsversuchen 1 und 2 mit 3,6 . 10^{-3} mol. $NaHCO_3$, in den Glykolyseversuchen 3, 4 und 5 mit 3 . 10^{-2} mol. $NaHCO_3$. Ferner in Gefäß 2 und 5 Zusatz 3 Proz. Äthylurethan; Versuch 3 und 4 ist eine Doppelbestimmung.

	Atmung		Glykolyse		
	1	2	3	4	5
Gefäßkonstante k	0,286	0,283	0,356	0,403	0,355
Gasraum	O_2	O_2	N_2+CO_2	N_2+CO_2	N_2+CO_2
Einsatz	0,1 ccm n NaOH	0,1 ccm n NaOH	—	—	—
Trockengewicht der Schnitte in mg	3,19	3,29	2,34	2,59	4,79
Schnittdicke d in mm	0,32	0,45	0,32	0,32	0,35
mm Druckänderg. pro 15 Minuten	— 40,5	— 11,5	+ 25,5	+ 20,5	+ 37,5
pro 30 Minuten	— 82	— 22	+ 48	+ 40,5	+ 66
Gas in cmm	— 23,4	— 6,2	+ 17,2	+ 16,3	+ 23,45
Q (cmm pro mg u. h)	14,7	3,79	14,6	12,6	9,78
			13,6 (Mittel aus 3 und 4)		
Hemmung in Proz.		74			28

Tabelle III.

Narkotische Hemmung von Atmung und Glykolyse an Säugetiergeweben. (Versuchsdauer 30 Minuten.)

Nr.	Gewebe	Narcoticum	Proz. Konzentration	Atmung Q_{O_2}	Atmung Proz. Hemmung	Glykolyse Q_{CO_2}	Glykolyse Proz. Hemmung
1	Graue Substanz von Rattenhirn	—	—	14,7	—	13,6	—
		Äthylurethan	3	3,79	74	9,78	28
2		—	—	12,2	—	17,5	—
		Äthylurethan	3	5,33	57	9,07	43
3		—	—	4,6	—	13,9	—
		Isobutylurethan	0,5	0	100	18,0	0
4		—	—	10,6	—	9,3	—
		Phenylurethan	0,1	3,09	72	2,09	78
5		—	—	8,42	—	12,5	—
		i-Amylalkohol	0,5	4,42	48	15,0	0
6	Hautepithel neugeboren. weiß. Mäuse	—	—	5,83	—	7,31	—
		Äthylurethan	3,0	2,02	65	2,35	68
7		—	—	6,88	—	7,87	—
		Phenylurethan	halb gesättigt	1,55	77	5,30	33
8	Rattencarzinom	—	—	9,04	—	32,7	—
		Äthylurethan	3,0	0	100	15,2	54
9		—	—	5,71	—	32,7	—
		Isobutylurethan	0,5	0	100	21,4	35
10		—	—	3,24	—	23,2	—
		i-Amylurethan	0,5	1,78	45	25,9	0

Da die anaerobe Glykolyse durch Narcotica sehr viel schwächer als die Atmung gehemmt wird, muß die Glykolyse in Sauerstoff unter der Wirkung der Narcotica bei geeigneter Dosierung ansteigen infolge des Wegfalls des Atmungseinflusses auf die Milchsäureproduktion. Falls die Atmung komplett, die Glykolyse nahezu gar nicht gehemmt wird, müssen anaerobe und aerobe Glykolyse einander gleich sein. Beides ist leicht nachzuweisen, wie die folgenden Beispiele an Froschrückenmark zeigen (Versuchsdauer 1 Stunde).

1.	aerobe Glykolyse ohne Zusatz	Q_{CO_2}	. . 1,53
	„ „ mit 3 Proz. Äthylurethan	Q_{CO_2}	. . 6,42
2.	Atmung in gesättigter Lösung von Heptylalkohol	Q_{O_2}	. . . 0
	anaerobe Glykolyse ohne Zusatz	Q_{CO_2}	. . 4,27
	„ „ mit Heptylalkohol gesättigt	Q_{CO_2}	. . 4,37
	aerobe „ „ „ „	Q_{CO_2}	. . 4,57

Zum Unterschied von den Narcotica wurde Natriumfluorid geprüft, dessen hemmende Wirkung auf die Glykolyse im Blute schon lange bekannt ist. In der Tat verhält sich das Natriumfluorid gerade umgekehrt wie die Narcotica, es hemmt die Glykolyse viel stärker als

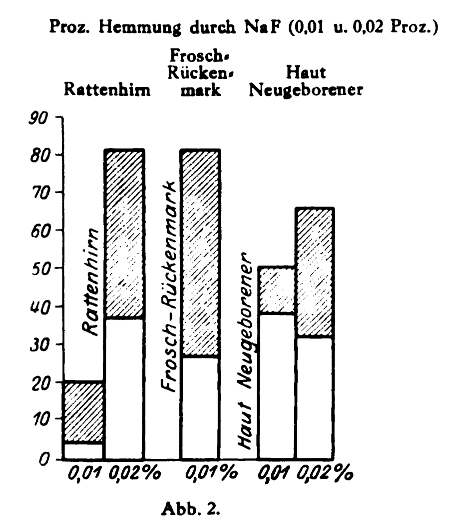


Abb. 2.
Weiße Felder: Hemmung der Atmung. Gesamtfelder: Hemmung der Glykolyse.

die Atmung. Dies ist auf Abb. 2 dargestellt, wo die weißen Felder die Atmungshemmung, die gesamten Felder die Hemmung der Glykolyse zeigen. Um eine Ausfällung des CaF_2 zu vermeiden, wurde in diesen Versuchen die Ringerlösung durch physiologische Kochsalzlösung mit

Bicarbonat ersetzt. Dies hatte in kurzen Zeiträumen nur einen unbedeutenden Einfluß auf die Größe von Atmung und Glykolyse.

Tabelle IV. Hemmung durch NaF.

Nr.	Gewebe	Proz. Konzentration NaF	Versuchszeit	Atmung		Glykolyse	
				Q_{O_2}	Proz. Hemmung	Q_{CO_2}	Proz. Hemmung
1	Frosch-rückenmark	—	1h			5,03	
		0,002				4,44	12
		0,01				1,12	78
		0,05				0,43	92
2	Frosch-rückenmark	—	1h	2,99		5,33	
		0,01		2,19	27	0,99	81
3	Hirnrinde (Ratte)	—	30′	11,6		8,24	
		0,01		11,1	4	6,58	20
4	Hirnrinde	—	30′	10,6		11,77	
		0,02		6,68	37	2,09	81
5	Haut neugeboren. Mäuse	—	30′	5,62		5,28	
		0,01		3,48	38	2,65	50
6	Haut neugeboren. Ratten	—	30′	3,54		7,08	
		0,02		2,42	32	2,37	66

II. Atmung und Glykolyse unter Zusatz verschiedener Zucker und verwandter Stoffe.

Für die Versuche dieses Kapitels wurde ausschließlich die graue Substanz des Rattenhirns benutzt. In dieser beträgt die Säurebildung ohne Zusatz von Zucker von vornherein nur etwa 10 Proz. derjenigen mit Glucose. Auch die Säuerung ohne Zucker ist, wie die chemische Kontrolle ergibt, auf Milchsäurebildung zurückzuführen. Jedenfalls geht aus dieser geringen spontanen Säurebildung hervor, daß die Rindensubstanz nur über einen minimalen Vorrat glykolysierbaren Zuckers verfügt. Ebenso fällt auch die Atmung in zuckerfreier Lösung hier schon im Laufe von 1½ Stunden auf ein Drittel, nach 2 bis 2½ Stunden auf ein Fünftel bis ein Achtel des ursprünglichen Wertes, während sie in Zuckerlösung in der ersten Zeit nur um 10 bis 20 Proz. gesunken ist, und auch nach 2 bis 2½ Stunden noch annähernd drei Viertel der Anfangsatmung beträgt. Daß die Atmung nicht wie die Glykolyse in zuckerfreier Lösung von vornherein so gering ist, wird man so deuten müssen, daß außer dem Zucker noch anderes oxydierbares Material in kleinen Mengen vorhanden ist. Dies ist jedenfalls zu einem Teil auch Nichtkohlehydrat, wie schon aus dem respiratorischen Quotienten hervorgeht,

der ohne Zuckerzusatz 0,86 ist. Andererseits sehen wir im folgenden, daß auch verschiedene Zucker veratmet werden können, ohne zu einer Glykolyse Anlaß zu geben. Es wurde entweder mit Schnitten desselben Gehirns oder in getrennten Versuchsserien der Einfluß derselben Substanzen auf die anaerobe Milchsäurebildung und auf die Aufrechterhaltung der normalen Atmung untersucht. Die Zeitdauer der Glykolyseversuche war meist 1 Stunde; die Atmungsversuche mußten für längere Zeit, mindestens 2 Stunden, fortgesetzt werden, um einen starken Atmungsabfall in zuckerfreier Lösung zu veranlassen. Die für die Entnahme des Gehirns benutzten Instrumente sowie die Gefäße

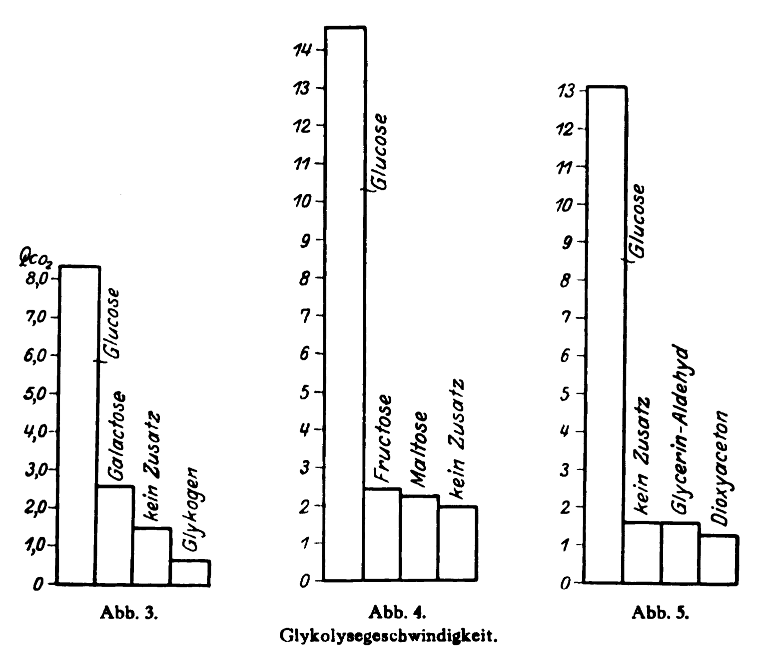


Abb. 3. Abb. 4. Abb. 5.

Glykolysegeschwindigkeit.

und Lösungen wurden sterilisiert, eine Maßnahme, die für die Versuchszeit ausreichte, um gegen Bakterien geschützt zu sein. Die Ergebnisse der Versuche sind in einer Reihe von Kurven und Tabellen mitgeteilt. Für die Glykolyse sind die Q_{CO_2}-Werte als Rechtecke gezeichnet, deren Höhe unmittelbar die Glykolysegeschwindigkeit angibt (siehe Abb. 3, 4 und 5). Der Einfluß der Substanzen auf die Atmung tritt deutlicher hervor, wenn der Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimeter pro Milligramm für die ganze Atmungszeit als Kurve dargestellt wird. Eine gerade Linie entspricht konstanter Atmungsgröße; der Winkel, den die Kurve an jeder Stelle gegen die Abszisse bildet, stellt die Oxydationsgeschwindigkeit in diesem Augenblick dar. Da für alle Kurven derselbe Maßstab benutzt ist, sind sie unter sich vergleichbar.

Was zunächst die anaerobe Glykolyse betrifft, so bildet von allen geprüften Zuckern neben Glucose nur noch Mannose und in geringem Maße Hexosephosphorsäure Milchsäure. Glykogen und Fructose (aus Inulin) sind vollständig wirkungslos, ebenso Maltose und Saccharose. Also auch hier ergibt sich wie bei der Narkosehemmung, daß die Glykolyse der Hirnrinde der des Carcinoms, aber nicht der des Muskels entspricht. Glycerinaldehyd (in einem von Herrn *Neuberg* freundlichst zur Verfügung gestellten Präparat) und Dioxyaceton (ein umkristalli-

Tabelle V.

Glykolyse durch verschiedene Zucker.

Nr.	Versuchszeit	Zusatz	Zusatz Proz.	d	Q_{CO_2}
1	45′	—	—	0,32	1,5
		Glucose	0,2	0,39	**8,3**
		Galaktose	0,2	0,23	2,55
		Glykogen	0,2	0,29	0,65
2	30′	—	—	0,40	2,5
		Glucose	0,2	0,28	**10,9**
		Fructose	0,2	0,32	2,3
		Maltose	0,2	0,39	2,4
3	1h	—	—		1,9
		Glucose	0,2		**14,6**
		Fructose	0,2		2,4
		Maltose	0,2		2,3
4	1h	—	—	0,25	1,6
		Glucose	0,2	0,30	**13,1**
		Glycerinaldehyd	0,1	0,38	1,5
		Dioxyaceton	0,1	0,29	1,3
5	1h	—	0,1		0,26
		Fructose	0,1		0,64
		Mannose	0,1		**6,4**
		Hexosephosphat	0,4		**2,8**
6	1/2h	—	—		
		Glucose	0,2	0,38	**12,3**
		Mannose	0,2	0,18	**9,4**
		Fructose	0,2	0,16	2,0
7	1h	Galaktose	0,2		1,7
		Glycerinaldehyd	0,1		1,7
		Dioxyaceton	0,1		2,05
8	1h	Glucose		0,36	**9,6**
		Saccharose		0,29	0,5
9	1h	—		0,22	0,57
		Glucose		0,21	**16,0**
		Glykogen		0,13	0,53
10	1h	—		0,28	1,52
		Glucose		0,23	**14,4**
		Maltose		0,22	2,13

Die Q_{CO_2}-Werte der wirksamen Substanzen sind fettgedruckt.

siertes Präparat von *Schering*) waren ebenso wirkungslos, im Gegensatz zu Methylglyoxal, über dessen Milchsäurebildung in der grauen Rindensubstanz kürzlich von Herrn *Meyerhof* berichtet wurde[1]). Über die Ergebnisse der Glykolysemessungen gibt die Tabelle V Auskunft. In einer besonderen Spalte ist die Schnittdicke (*d*) der Gewebsschnitte verzeichnet.

Die geringfügige Säurebildung ohne Traubenzucker sinkt im Laufe von 1 bis 2 Stunden noch auf einen kaum meßbaren Wert ab, während die Glykolyse in Traubenzuckerlösung in dieser Zeit nur auf etwa die Hälfte fällt. Auch in dieser Beziehung verhalten sich die unwirksamen Zucker wie zuckerfreie Lösung. Dies zeigen die beiden folgenden Beispiele.

Nr.	Zuckerzusatz	Q_{CO_2} in der		
		ersten halben Stunde	zweiten halben Stunde	zweiten Stunde
1	Glucose	12,3	8,7	4,0
	Fructose	2,0	2,0	0,2
2	Kein Zusatz . .	1,8	1,2	0,08
	Glucose	16,3	12,8	9,7
	Maltose	2,6	1,7	0,43

Außer bei Glucose war es speziell bei Hexosephosphorsäure von Wichtigkeit, festzustellen, ob der Bicarbonatzersetzung eine Bildung von Milchsäure quantitativ entspricht, da hier möglicherweise auch die Abspaltung von anorganischem Phosphat etwas Kohlensäure hätte freisetzen können. Die chemische Kontrolle ergab jedoch eine gute Übereinstimmung. Das Natriumhexosephosphat wurde durch Umsatz von Calciumhexosephosphat (Candiolin von Bayers Farbwerken) mit der entsprechenden Menge Natriumoxalat hergestellt. Die Anwesenheit des Hexosephosphats in den Glykolyseversuchen führt zu einer Retention von Kohlensäure, deren Größe durch Einkippen einer titrierten Menge Milchsäure in die hexosephosphathaltige Ringer-Bicarbonatlösung festgestellt wurde. Bei den hier gebrauchten Mengenverhältnissen beträgt die Retention 18 Proz. des durch die Druckmethode gemessenen Ausschlags. Diese Korrektur ist in der folgenden Versuchsübersicht für die Berechnung der gebildeten Milchsäure aus dem Kohlensäuredruck angebracht.

Versuch. Hirnschnitte von drei Ratten, gemischt, zum Teil über Grenzschnittdicke, werden vor dem Versuch in Ringerlösung feucht gewogen, für die Berechnung des *Q*-Wertes ist das Feuchtgewicht durch 6 dividiert worden. Die Schnitte werden in 4 ccm Ringer-Bicarbonatlösung aufge-

[1]) Diese Zeitschr. **159**, 432 (1925).

schwemmt, die sich in flachen Respirationsgefäßen von 25 ccm Inhalt befindet. Gasraum: Stickstoff + Kohlensäure. Dauer der Gasmessung 2 Stunden, Gesamtzeit 2 Stunden 32 Minuten. Nach Schluß des Versuchs werden die Schnitte mit Flüssigkeit chemisch auf Milchsäure verarbeitet. Methode siehe bei *O. Meyerhof*[1]).

Feuchtgewicht der Schnitte	Zusatz	CO_2 in 2 Std. cmm	Q_{CO_2} (N_2)	Milchsäure berechnet mg	Milchsäure berechnet Proz.	Milchsäure gefunden mg	Milchsäure gefunden Proz.	Differenz gefunden — berechnet Proz.
0,549	—	37	1,9	0,46	0,084	0,46	0,084	0,00
0,716	0,2 Proz. Glucose	222	9,9	3,04	0,42	3,6	0,50	+ 0,08
0,684	0,4 Proz. Na-hexosephosphat	79	3,7	1,04 + 0,19	0,18	1,5	0,22	+ 0,04

Besonderes Interesse hat im Vergleich zur glykolytischen Wirksamkeit die Atmungswirksamkeit der verschiedenen Zucker. In mehreren Fällen läuft beides parallel. Ebenso wie Glucose hält Mannose die Atmung aufrecht, während Galaktose, Glykogen, Saccharose und die Triosen weder Milchsäure bilden noch veratmet werden. Auffällig dagegen ist das Verhalten von Fructose und Maltose. Beide halten die Atmung aufrecht, ohne daß sie glykolytisch gespalten werden. Ja, Fructose unterscheidet sich kaum von Traubenzucker, während allerdings die Atmung mit Maltosezusatz geringer ist. Daß in der Tat Fructose oxydiert wird, geht auch aus dem respiratorischen Quotienten in Gegenwart von Fruchtzucker hervor, der fast genau 1 ist; vgl. Tabelle VI, in der auch noch der respiratorische Quotient mit Milchsäurezusatz verzeichnet ist.

Der respiratorische Quotient wurde in der üblichen Weise durch Kombination dreier Messungen bestimmt: 1. Gefäß mit NaOH im Einsatz, zur Messung des Sauerstoffverbrauchs, 2. Gefäß ohne NaOH mit 0,3 ccm n HCl im Anhang zur Bestimmung der präformierten Kohlensäure, 3. ebenso gefülltes Gefäß zur Bestimmung der am Schluß vorhandenen Kohlensäure; zur Kontrolle meist noch ein viertes Gefäß zur Bestimmung der präformierten Kohlensäure ohne Gewebsschnitt. Die gebildete und präformierte Kohlensäure muß auf die Schnittgewichte des Sauerstoffverbrauchs umgerechnet werden. Für die Messungen dienten Gefäße von etwa 12 ccm Gasraum. Um die Ausschläge möglichst groß zu machen, wurden mehrere Schnitte im Gesamtgewicht von etwa 15 mg Trockensubstanz in jedes Gefäß gefüllt und meist zwei Hirne zu jedem Versuch verwandt. Der Sauerstoffverbrauch betrug in 2 Stunden etwa 200 cmm, so daß der respiratorische

[1]) Pflügers Arch. 204, 305. 1924.

Quotient auf wenige Prozent genau bestimmt werden konnte. Die Ringerlösung wurde statt mit Bicarbonat mit ein Zehntel einer isotonischen Natriumphosphatlösung von p_H 7,4 versetzt.

Tabelle VI.

Respiratorischer Quotiènt in der grauen Substanz.

(Versuchsdauer 2 Stunden.)

Nr.	Zusatz	Proz.	Q_{O_2}	R.-Q.	R.-Q. Durchschnitt
1	Ohne Zusatz	—	3,38	0,84	0,86
2	„ „	—	3,85	0,88	
3	Fructose	0,2	7,5	0,95	0,99
4	„	0,2	8,3	1,00	
5	„	0,2	8,5	1,03	
6	Milchsäure	0,3	8,95	0,95	0,92
7	„	0,3	9,55	0,95	
8	„	0,3	9,7	0,91	
9	„	0,3	10,15	0,87	

Daraus, daß Fructose zwar oxydiert wird, aber keine Milchsäure bildet, müssen wir schließen, daß sie auf einem anderen Wege als über Milchsäure verbrennt. Es liegt nahe, dieses Resultat auch auf die anderen Zucker zu erweitern. Es würde dann auch Glucose auf einem anderen Wege als über Milchsäure verbrannt werden, und die Milchsäure wäre kein Zwischenprodukt des oxydativen Zuckerzerfalls, wie oben bereits diskutiert worden ist. Noch schwieriger ist das Verhalten der Maltose zu deuten, deren Atmungswirksamkeit allerdings kleiner ist. Entweder wird diese oxydiert, ohne in Glucose gespalten zu sein, oder die aus ihr gebildete Glucose kann schon in einer sehr niedrigen Konzentration verbrennen, in der sie noch keine Milchsäure bildet. Zum Unterschied von Fructose bildet Hexosephosphat langsam Milchsäure, ohne deutlich die Atmung aufrecht zu erhalten. Jedoch ist vielleicht auch hier eine geringfügige Wirksamkeit vorhanden (s. Versuch 5, Tabelle VII und Versuch S. 229).

Außer den genannten Zuckerarten sind noch eine Reihe anderer Stoffe auf ihre Atmungswirksamkeit geprüft. Wie *O. Meyerhof*, *R. Meier* und *K. Lohmann* fanden, erhöhen milchsaures und brenztraubensaures Natrium die Atmung des Zwerchfells und des Lebergewebes, und zwar offenbar auf dem Wege der Umwandlung in Kohlehydrat. Dementsprechend bleibt die Atmungsgröße dabei nicht nur für viele Stunden konstant, sondern ist wegen der mit der Synthese verknüpften Oxydationssteigerung sogar absolut noch größer als in Zuckerlösung. In der Leber wirken Alanin und Asparagin etwa ebenso, wobei Ammoniak abgespalten wird, im Muskel dagegen nicht. Der Einfluß dieser vier

Substanzen auf die Atmung des Gehirns ist nun demjenigen auf das Zwerchfell ähnlich. Alanin und Asparagin sind völlig ohne Wirkung. Dagegen halten Milchsäure und Brenztraubensäure die Atmung fast ebensogut aufrecht wie Glucose. Allerdings ist die Atmung hierbei nicht größer als mit Zucker. In der Tabelle VII ist eine Auswahl aus den Versuchen zusammengestellt. (Eine Reihe weiterer ergab dieselben Resultate.) In den Spalten 1 bis 5 ist der Q_{O_2}-Wert für eine halbe Stunde angegeben, und zwar für vier bis fünf aufeinanderfolgende

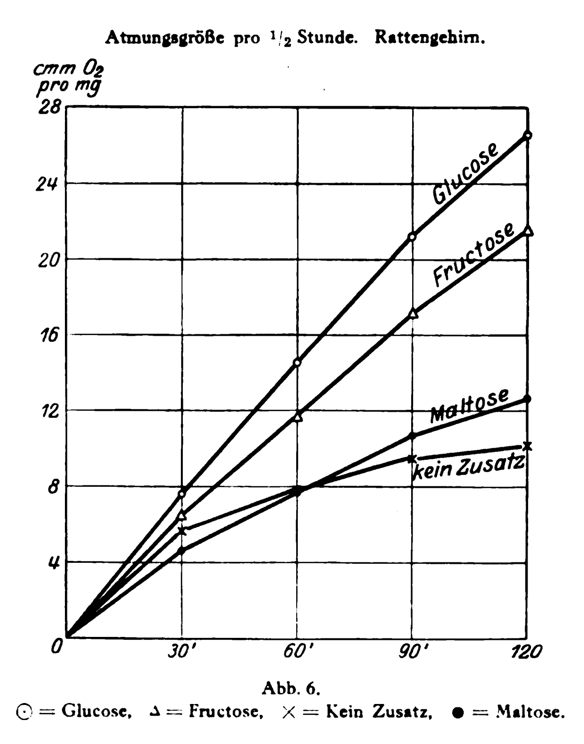


Abb. 6.
⊙ = Glucose, ∆ = Fructose, × = Kein Zusatz, ● = Maltose.

halbe Stunden. In den beiden letzten Spalten ist die Atmungsgröße der letzten halben Stunde in Prozenten des Anfangswertes ausgedrückt. Diese Zahl gibt einen besonderen guten Eindruck von der Konstanz der Atmung. Diejenigen Werte, die eine Aufrechterhaltung der Atmung anzeigen, sind fett gedruckt. Die Konzentration der Zucker betrug durchgehend wie bei den Glykolyseversuchen 0,2 Proz. Die Triosen wurden in 0,1 proz. Lösung, milchsaures Na in m/40 und brenztraubensaures Na in m/40 und m/140 Lösung verwandt.

Außerdem sind auf den Abb. 6 bis 10 eine Reihe von Versuchen in Kurven dargestellt. Auf der Ordinate sind Kubikmillimeter Sauer-

stoff pro Milligramm angegeben, auf der Abszisse die Zeit in Stunden. Die atmungswirksamen Stoffe ergeben annähernd eine gerade Linie.

Die Tatsache, daß Milchsäure und Brenztraubensäure die Atmung ungefähr ebensogut wie Zucker aufrecht erhalten können, gibt zu zwei Fragen Anlaß:

1. Beweist die Aufrechterhaltung der Atmung, daß diese Stoffe direkt oder indirekt von der Rindensubstanz oxydiert werden?

2. Wenn dies der Fall ist, werden die Säuren direkt oxydiert oder erst nach Umwandlung in Zucker?

Atmungsgröße pro 1/2 Stunde. Rattengehirn.

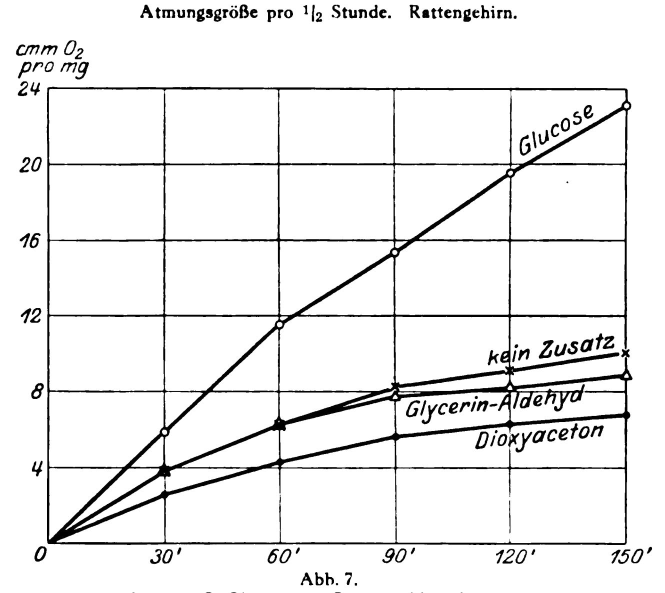


Abb. 7.
× Kein Zusatz, ⊙ Glucose, △ Glycerinaldehyd, ● Dioxyaceton.

Daß die erste der genannten Fragen zu bejahen ist, ist schon an und für sich ziemlich wahrscheinlich. Ich habe diese Annahme für die Milchsäure durch zwei Versuchsserien zu stützen versucht, indem ich 1. den respiratorischen Quotienten und 2. den Einfluß der Milchsäure auf die Ammoniakabspaltung der Hirnrinde untersucht habe. Aus vier in der Tabelle VI mitgeteilten Bestimmungen ersieht man, daß der respiratorische Quotient durchschnittlich 0,92 ist, größer als ohne Zusatz, wenn auch scheinbar kleiner als mit Zucker. Die Fehlergenauigkeit dieser Messungen ist aber nicht sehr hoch. Für beweisender halte ich die Versuche über die Ammoniakabspaltung. Milchsäure und Brenztraubensäure schränken die Ammoniakabspaltung bei der Atmung des Zwerchfells ungefähr ebenso ein wie Zucker, nämlich

Atmungsgröße pro $^1/_2$ Stunde. Rattengehirn.

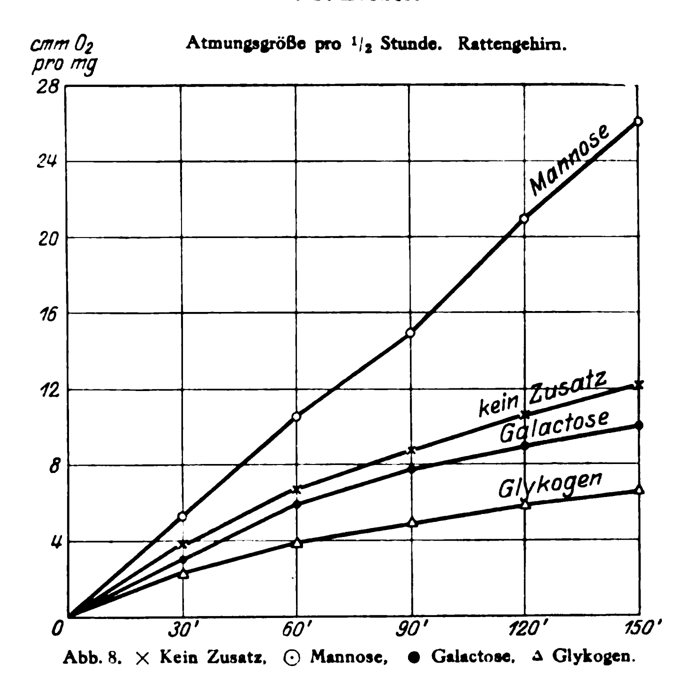


Abb. 8. × Kein Zusatz, ⊙ Mannose, ● Galactose, △ Glykogen.

Atmungsgröße pro $^1/_2$ Stunde. Rattengehirn in *Phosphat-Gemisch* pH 7,4 (Phosphat: Ringer = 1 : 10).

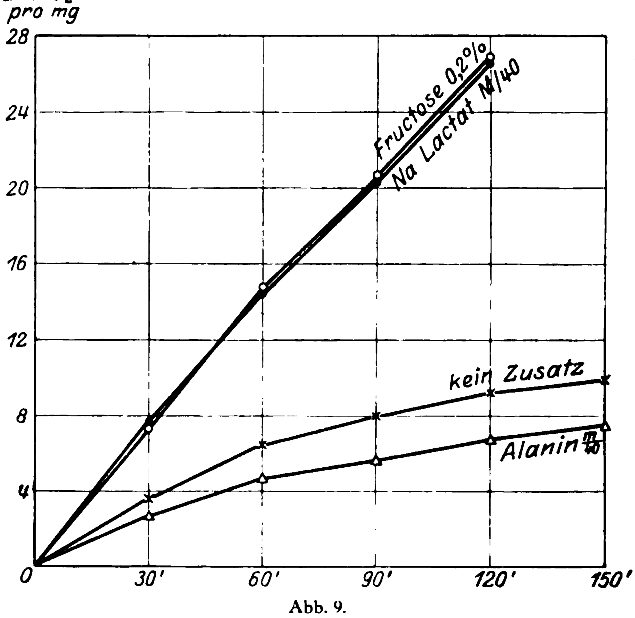


Abb. 9.
× Ohne Zusatz (Mittel von 2), ⊙ Fructose 0,2 Proz., ● Na Lactat m/40, △ Alanin.

Tabelle VII. Wirksamkeit verschiedener Substanzen auf die Atmung des Rattenhirns. (Vergleiche auch hierzu Abb. 6—10.)

Nr.	Zusatz	Q-Werte für aufeinanderfolgende halbe Stunden					Atmung	
		1.	2.	3.	4.	5.	in der vierten halben Stunde Proz.	in der fünften halben Stunde Proz.
1	Kein Zusatz	8,85	7,6	5,57	4,1	—	47	—
	Glucose	12,6	11,8	10,9	9,3	—	74	—
	Galaktose	10,4	7,3	5,5	3,5	—	34	—
	Glykogen	6,3	3,6	2,9	2,1	—	33	—
2	Kein Zusatz	11,2	4,4	3,3	1,35	—	12	—
	Glucose	15,1	14,0	13,4	10,6	—	70	—
	Fructose	12,8	10,5	11,1	8,7	—	68	—
	Maltose	9,3	6,3	5,9	3,95	—	43	—
3	Kein Zusatz	7,3	5,6	(1,2)	(1,2)	0,75	—	10
	Glucose	9,03	7,7	6,5	7,3	6,6	—	73
	Fructose	11,7	11,3	10,5	10,7	10,7	—	92
	Maltose	8,8	8,5	4,3	5,8	4,3	—	48
4	Kein Zusatz	7,7	4,8	3,2	2,0	1,9	—	25
	Glucose	11,8	11,2	8,9	7,3	7,0	—	59
	Glycerinaldehyd	7,8	4,9	3,1	0,9	1,1	—	14
	Dioxyaceton	5,3	3,6	2,5	1,5	0,9	—	18
5	Kein Zusatz	6,1	3,2	3,1	1,2	0,9	—	15
	Glucose	12,2	9,9	11,7	8,2	7,7	—	63
	Fructose	11,0	9,9	11,3	9,0	8,5	—	77
	Hexosephosphat	5,5	4,7	4,9	1,7	1,4	—	26
6	Kein Zusatz	5,1	3,3	3,0	0,95	—	19	—
	Glucose	10,6	9,1	8,4	5,9	—	55	—
	Mannose	9,7	9,4	9,4	8,1	—	83	—
	Milchsaures-Na	8,9	8,1	7,9	6,2	—	69	—
	Brenztraubensaures-Na	7,3	8,9	7,3	5,4	—	74	—
7	Kein Zusatz	9,2	5,7	4,2	1,9	1,8	—	20
	Mannose	15,2	13,2	11,7	10,0	10,1	—	67
	Milchsaures-Na	11,6	9,0	7,6	6,2	5,3	—	46
	Brenztraubensaures-Na	15,8	12,5	11,0	9,3	8,6	—	54
8	Kein Zusatz	11,0	6,9	5,2	3,5	2,8	—	25
	Glucose	13,0	10,5	11,1	10,1	10,3	—	79
	Milchsaures-Na	13,4	11,0	11,0	9,5	8,8	—	66
	Alanin	8,85	8,7	2,7	3,7	2,9	—	33
9	Kein Zusatz	7,7	5,9	4,2	3,6	2,7	—	36
	Mannose	10,6	10,7	10,4	10,2	10,1	—	95
	Galaktose	6,2	5,8	3,5	2,3	2,3	—	37
	Glykogen	4,8	3,0	2,2	1,9	1,3	—	27
10	Kein Zusatz	8,5	5,7	3,6	3,8	2,1	—	25
	Glucose	11,4	11,3	10,1	12,0	10,6	—	93
	Glycerinaldehyd	9,1	6,3	3,8	3,4	1,8	—	19
	Acetaldehyd	6,7	4,9	3,1	3,2	1,4	—	22
11	Kein Zusatz	5,6	(3,1)	3,1	0,8	—	14	—
	Glucose	8,5	(10)	10,0	9,0	—	100	—
	Saccharose	5,2	(3,4)	3,4	1,2	—	23	—

auf ein Drittel bis ein Zehntel des ursprünglichen Wertes[1]). Andererseits schwindet dabei die Milchsäure und Brenztraubensäure oxydativ auf dem Wege über Zucker. Nun wird in absoluter Rechnung die Ammoniakabspaltung in der Hirnsubstanz durch Zucker nicht so stark verringert. Pro Milligramm Trockengewicht beträgt sie in 2 Stunden mit Zucker nur 20 bis 50 Proz. weniger als in zuckerfreier Lösung. Sehr beträchtlich ist jedoch der Unterschied, wenn man die Ammoniakbildung mit dem Sauerstoffverbrauch in beiden Fällen vergleicht. Die Atmung der Hirnsubstanz ist in 2 Stunden in reiner Ringerlösung ja nur ein Drittel bis ein Viertel so groß wie mit Glucose. Bezogen auf den Sauerstoffverbrauch, ist also die Ammoniakbildung in Zucker

Atmungsgröße pro 1/2 Stunde. Rattengehirn.

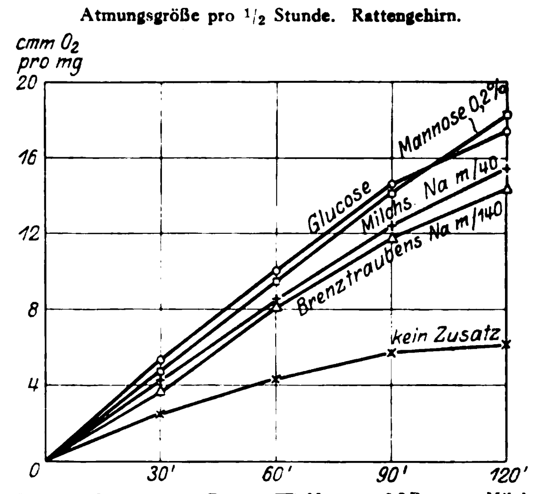


Abb. 10. × Kein Zusatz, ⊙ Glucose 0,2 Proz., ⊡ Mannose 0,2 Proz. ✱ Milchsaures Na, m/40, △ Brenztraubens. Na, m/140.

nur ein Drittel bis ein Viertel so groß, übereinstimmend mit dem Umstand, daß die Aufrechterhaltung der Atmung auf die Oxydation des Zuckers zurückzuführen ist. Und in dieser Beziehung verhält sich das milchsaure Natrium angenähert ebenso. Die Einschränkung der Ammoniakbildung mit milchsaurem Na ist absolut sehr geringfügig — wohl noch geringer als mit Zucker —; sehr deutlich ist dagegen auch hier, daß pro Einheit veratmeten Sauerstoffs die Ammoniakbildung stark herabgeht. Die Aufrechterhaltung der Atmung durch milchsaures Na wird man daher auch nicht auf eine allgemeine Steigerung der Oxydation beziehen können, sondern die Milchsäure muß, ähnlich wie der Zucker, selbst veratmet werden. Ob dies direkt oder auf

[1]) *O. Meyerhof*, *R. Meier* und *K. Lohmann*, l. c.

dem Wege über Zucker geschieht, kann allerdings nicht entschieden werden[1]).

Für die Ausführung der Ammoniakmessung nach der *Folin*schen Methode folgte ich den Angaben von *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier* in der angeführten Arbeit.

In der Tabelle VIII sind die Versuche zusammengestellt. Bei reiner Eiweißverbrennung sollte auf 4 bis 5 Mol. Sauerstoff 1 Mol. Ammoniak abgespalten werden. Dieses ist angenähert in Abwesenheit von Zucker der Fall, wobei allerdings gut die Hälfte des Ammoniaks

Tabelle VIII.

Ammoniakabspaltung in Gegenwart von Zucker und milchsaurem Natrium.

Nr.	Versuchszeit	Trockensubstanz mg	Zusatz	Atmosphäre	Ammoniak pro mg u. Std. γ	Q_{O_2}	$\frac{\text{Mol. } O_2}{\text{Mol. } NH_3}$
1	2h	13,32	—	O_2	0,38	4,1	8,2
		13,19	0,2 Proz. Glucose	O_2	0,32	15,0	35,9
2	3 15′	4,83	—	O_2	0,50	5,4	8,2
		6,08	0,2 Proz. Glucose	O_2	0,25	11,1	34
		4,30	0,2 „ „	N_2	0,32	—	—
3	2	13,71	—	O_2	0,38	3,8	7,6
		11,40	—	N_2	0,215	—	—
4	2	14,13	—	O_2	0,54	3,38	4,8
		12,34	m/40 milchs. Na	O_2	0,47	8,3	13,0
5	2	12,03	—	O_2	0,59	6,5	8,35
		9,43	m/40 milchs. Na	O_2	0,39	9,45	18,7
6	2 30	6,07	—	O_2	0,73	7,1	7,4
		6,25	m/40 milchs. Na	O_2	0,69	10,7	11,8
		6,59	—	N_2	0,46	—	—
		5,14	m/40 milchs. Na	N_2	0,56	—	—
7	2	12,62	—	O_2	0,55	3,5	4,8
		12,51	m/40 milchs. Na	O_2	0,41	10,8	19,9

[1]) Einen unmittelbaren Beweis für die Oxydation der Milchsäure aus zugesetztem Natriumlactat durch die graue Substanz des Rattenhirns fand Herr *Meyerhof* inzwischen in einer anderen Versuchsanordnung: Bestimmt man nämlich in der Kästchenmethode von *Warburg* (diese Zeitschr. **152**, 51, 1924) in Ringerlösung mit $3 \cdot 10^{-2}$ Bicarbonat bei einem CO_2-Druck von 40 mm Hg den scheinbaren respiratorischen Quotienten, so ist dieser in Gegenwart von Zucker weit über 1 infolge der neben der Oxydation einherlaufenden aeroben Glykolyse; bestimmt man ihn dagegen in Gegenwart von milchsaurem Natrium ohne Zucker, so ist er nur 0,4 — 0,85, während der wahre respiratorische Quotient 0,9 ist (s. oben Tabelle VI). Dieses letztere erklärt sich daraus, daß bei dem Verschwinden des milchsauren Natriums das zurückbleibende Alkali Kohlensäure retiniert, wobei in erster Annäherung pro 1 Molekül umgesetzter Milchsäure 1 Molekül Kohlensäure aus dem Gasraum verschwindet.

auch schon in Stickstoff erscheint. Vielleicht entspricht dieses Verhalten dem des Lebergewebes in Gegenwart von Asparagin und Alanin[1]), wo das Amidammoniak des Asparagins in Stickstoff ebensogut wie in Sauerstoff abgespalten wird, die Aminogruppe des Alanins dagegen weit geringer. In den Sauerstoffversuchen ist gleichzeitig die Atmung gemessen und der Q_{O_2}-Wert und das Verhältnis $\frac{\text{Mol. } O_2}{\text{Mol. } NH_3}$ berechnet. Die Ammoniakmenge ist in $\gamma = 10^{-6}$ g verzeichnet.

Zusammenfassung.

In der vorstehenden Arbeit wird die Beeinflussung der Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe, vor allem Froschrückenmark und graue Substanz des Rattengehirns, untersucht im Hinblick auf ihre Übereinstimmung mit dem Kohlehydratumsatz einerseits im Muskel, andererseits im Carcinom.

Die Narcotica hemmen die Glykolyse stets schwächer als die Atmung, und zwar übereinstimmend im Rückenmark, der grauen Gehirnsubstanz, dem wachsenden Epithel und Carcinomgewebe. Infolgedessen steigt wegen der Gültigkeit des „Oxydationsquotienten" der Milchsäure die Glykolyse in Sauerstoff bei geeigneter Narcoticumkonzentration stark an. Aber auch für die Glykolysehemmung gilt die Regel der homologen Reihe, und die höchsten Glieder wirken erheblich stärker als bei der Stoffwechselhemmung in Gewebsextrakten. Umgekehrt wie die Narcotica verhält sich NaF, das die Glykolyse viel stärker hemmt als die Atmung.

Die glykolytische Wirksamkeit der Zucker stimmt ziemlich genau mit derjenigen im Carcinom überein und unterscheidet sich stark von der im Muskel. Glykogen, Fructose und Maltose sind wirkungslos, ebenso die Triosen. Neben Glucose bildet nur noch Mannose eine erhebliche Menge Milchsäure, in geringerem Grade Hexosephosphorsäure. Anders ist die Wirkung der Zucker auf die Atmung. Die Atmungsgröße fällt in Abwesenheit von Zucker in etwa 2 Stunden auf 10 bis 20 Proz. des Anfangswertes, wird aber durch Glucose zu 70 bis 90 Proz. aufrecht erhalten. Hier läßt sich Glucose durch Fructose vollständig ersetzen; dies, ebenso wie der respiratorische Quotient 1 in Gegenwart von Fructose, zeigt, daß diese von der Rindensubstanz oxydiert wird, ohne Milchsäure bilden zu können.

Während die Triosen keine Wirkung auf die Atmung besitzen, halten Milchsäure und Brenztraubensäure die Atmung annähernd

[1]) Siehe die angeführten Arbeiten von *O. Meyerhof*, *K. Lohmann*, *R. Meier*.

so gut aufrecht wie Zucker. Auch hier muß man annehmen, daß diese Säuren verbrennen, entweder direkt oder nach Umwandlung in Zucker. Dafür spricht ferner, daß die Ammoniakabspaltung der Gehirnsubstanz, die auf Eiweißzersetzung zu beziehen ist, zwar absolut nur unwesentlich durch milchsaures Na eingeschränkt wird — etwas stärker durch Zucker — aber das Verhältnis: $\frac{\text{verschwunden Mol. Sauerstoff}}{\text{gebildete Mol. Ammoniak}}$ in Lactat stark anwächst. Ohne Zusatz beträgt es 4,8 bis 8,4, in Zucker etwa 35, in Gegenwart von milchsaurem Na 12 bis 20. In Verbindung mit dem Verhalten der Fructose ist es wahrscheinlich, daß diese Oxydation der Milchsäure nach Rückverwandlung in Zucker geschieht, wenn auch die direkte Verbrennung der Milchsäure sich nicht ausschließen läßt.

Über lösliche und unlösliche Salze der Hexose-di-phosphorsäure.

Von

Carl Neuberg und Sebastian Sabetay.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Für die Versuche über die Bildung und Zerlegung der Hexose-di-phosphorsäure, die in einer Reihe von Arbeiten aus dem hiesigen Institut beschrieben worden sind und die nach verschiedenen Richtungen hin fortgesetzt werden sollen, war es wichtig, schnell in den Besitz reinen Ausgangsmaterials kommen zu können.

Als erste kristallisierte Verbindung, in der noch das vollkommen unveränderte Molekül der Hexose-di-phosphorsäure vorhanden ist, hatten *C. Neuberg* und *O. Dalmer*[1]) das hexose-di-phosphorsaure Strychnin erhalten. Später ist von *G. Embden* und *M. Zimmermann*[2]) noch ein anderes Alkaloidsalz, die Brucinverbindung, dargestellt worden. Aus dem kristallisierten und einheitlichen Strychninsalz kann man in bekannter Weise anorganische Salze der Hexose-di-phosphorsäure bereiten. Allein dieser Weg ist umständlich. Wir suchten daher nach einem Verfahren, um von einem jetzt käuflichen Produkt von hexose-di-phosphorsaurem Calcium, dem Candiolin, ausgehend, zu einwandfreien Salzen zu gelangen. Das Produkt der Firma Fr. Bayer & Co., der wir für wiederholte Überlassungen des Ausgangsmaterials in den letzten 3 Jahren zu großem Danke verpflichtet sind, enthält neben kleinen Mengen von stickstoffhaltiger Substanz[3]) wechselnde Mengen von anorganischen Calciumphosphat und andere Verunreinigungen. Abweichungen von der theoretischen Zusammensetzung sind bei einer

---

[1]) *C. Neuberg* und *O. Dalmer*, diese Zeitschr **131**, 188, 1922.

[2]) *G. Embden* und *M. Zimmermann*, H. **141**, 226, 1924. Die Autoren beziehen sich in dieser Arbeit auf ein von *Neuberg* und *Dalmer* beschriebenes Brucinsalz. Dabei handelt es sich jedoch, wie uns Herr Prof. *Embden* mitteilt, um eine Verwechslung, indem jenes im Jahre 1922 von *Neuberg* und *Dalmer* gewonnene Strychninsalz (siehe oben) gemeint ist.

[3]) Vgl. die Beobachtungen von *C. Neuberg*, *E. Färber*, *A. Levite* und *E. Schwenk* (diese Zeitschr. **83**, 260, 1917) an einem anderen käuflichen Präparat, dem Glucofos.

Handelsware nicht verwunderlich, sie sind aber zu groß, als daß mit dem käuflichen Material unmittelbar präzise Untersuchungen ausgeführt werden könnten.

Die Reinigung von käuflichem hexosephosphorsaurem Calcium nehmen wir folgendermaßen vor:

10 g Candiolin werden in 64 ccm 2 n HCl unter Zusatz von 50 ccm Wasser in der Kälte gelöst. Ohne zu filtrieren fügt man unter *Eiskühlung* 65 bis 66 ccm 2 n NaOH tropfenweise hinzu. Beigemengte Phosphate und eventuelle Spuren von hexose-di-phosphorsaurem Calcium fallen dabei unlöslich aus, von letzterem jedoch nur wenig, da das Hexose-di-phosphat in *kaltem* Wasser löslich ist. Man saugt alsdann ab und neutralisiert *genau* mit Salzsäure. Die klare Lösung wird nunmehr auf dem Wasserbade bis auf 70° erhitzt, wobei sich das in der Wärme schwer lösliche Calcium-hexose-di-phosphat in gut filtrierbarer Form abscheidet. Dasselbe wird abgesaugt und auf der Nutsche mit *heißem* Wasser ausgewaschen. Das so bereitete Salz besteht aus mikroskopischen Kügelchen. Es ist in kaltem wie warmem Wasser schwer löslich, leicht dagegen in Mineralsäuren und auch in Essigsäure oder Milchsäure. Wenn eine eisgekühlte Lösung in verdünnter Säure nach gehöriger Verdünnung und Neutralisation durch Ammoniak mit Magnesiamixtur keine Fällung mehr gibt, ist das Salz rein. Andernfalls muß die beschriebene Prozedur [Lösen in Salzsäure, Zugabe eines kleinen Überschusses von Natronlauge, Filtration, genaue Neutralisation mit Salzsäure und Abscheidung in der Hitze[1])] wiederholt werden.

Eine *lösliche Modifikation*, die für viele Zwecke, namentlich für enzymatische Studien, sehr brauchbar ist, gewinnt man auf folgende Art: Das reine hexose-di-phosphorsaure Calcium wird in möglichst wenig verdünnter Milchsäure gelöst und mit Ammoniak unter Eiskühlung bis zur deutlichen Alkalinität auf Lackmus versetzt; man filtriert klar und fällt darauf mit Alkohol. Die amorphe und voluminöse Masse wird auf der Nutsche mit Alkohol bis zur Entfernung von Ammoniak und dem auch in starkem Alkohol leicht löslichem Ammoniumlactat gewaschen. Dieses Salz, das durch Absaugen von Weingeist befreit wird und nach dem Waschen mit Äther an der Luft getrocknet werden kann, löst sich glatt in Eiswasser. Aus dieser Lösung scheidet sich beim Erhitzen wiederum die oben erwähnte schwer lösliche und grobkörnige Modifikation aus.

Aus der unlöslichen Modifikation des Calciumsalzes kann man das lösliche *Kaliumsalz* dadurch bereiten, daß man eine wässerige Suspension mit etwas weniger als der berechneten Menge Di-kaliumoxalat digeriert.

---

[1]) Vgl. hierzu die Angaben von *A. Harden* und *W. J. Young*, *L. Iwanoff* sowie *A. Lebedew*.

Hierzu ist die Unterstützung der Reaktion durch mechanische Schüttlung erforderlich; das Ende der Umsetzung erkennt man an dem Verschwinden der Oxalat-ionen. Verdünnte Lösungen des Kaliumsalzes (und analog des Natriumsalzes usw.) kann man selbstverständlich auch aus der wasserlöslichen Modifikation der Calciumverbindung leicht darstellen.

Das rohe *Bariumsalz* der Hexose-di-phosphorsäure, das man gemäß den Angaben der Literatur — aus phosphathaltigen Zuckerlösungen nach der Einwirkung phosphorylierender Hefenpräparate — durch Fällung mittels Bariumchlorid oder Bariumacetat gewinnt, läßt sich ganz ebenso wie das Calciumsalz reinigen und auf die zuvor angegebene Art ebenfalls in eine *lösliche Modifikation* überführen.

Größeres Interesse bietet das *Magnesiumsalz des Hexose-di-phosphorsäure-esters*. Dasselbe ist nämlich leicht erhältlich und viel löslicher als die übrigen Erdalkaliverbindungen. Man gelangt zu dem Magnesiumsalz, wenn man das reine Calciumsalz in Wasser suspendiert und mit der äquivalenten Menge wässeriger Oxalsäurelösung bis zum Verschwinden der Oxalat-ionen schüttelt. Nach Filtration vom Calciumoxalat neutralisiert man die freie Hexose-di-phosphorsäure durch Schütteln mit *reinem* Magnesiumoxyd. Wegen der geringen Löslichkeit der Bittererde in Wasser[1]) nimmt die Flüssigkeit dabei schwach alkalische Reaktion an. Man leitet Kohlensäure ein, filtriert, falls nötig, und gießt in die vierfache Menge absoluten Alkohols. Dabei fällt das Magnesium-hexose-di-phosphat als körnige Masse aus, die sich nach mehrstündigem Stehen ohne jede Schwierigkeit absaugen läßt. Das mit Alkohol ausgewaschene Salz wird in Eiswasser gelöst, von einer kleinen Trübung (Magnesiumcarbonat) abfiltriert und abermals mit Alkohol niedergeschlagen. Die nunmehr erhaltene Substanz ist rein und bildet farblose Körnchen.

Für die Analysen wurde ein lufttrockenes Präparat verwendet, das bei 55° im Hochvakuum 27,42 Proz. an Gewicht verlor. Die folgenden Zahlen beziehen sich auf die wasserfreie Verbindung.

0,0606 g Substanz geben 0,0348 g $Mg_2P_2O_7$ (als Asche).
0,0707 g „ „ 0,0398 g $Mg_2P_2O_7$ (P-Bestimmung).
0,0722 g „ „ 0,0434 g $Mg_2P_2O_7$ (Mg-Bestimmung).

$C_6H_{10}O_{12}P_2Mg_2$. Ber.: Asche = 57,90; P = 16,14; Mg = 12,64 Proz.
(384,7) Gef.: „ = 57,43; P = 15,70; Mg = 13,13 „ .

Die Analysen zeigen, daß das normale Magnesiumsalz vorliegt.

---

[1]) Von $Mg(OH)_2$ lösen sich $1,5 \cdot 10^{-4}$ Mol oder 0,0087 g im Liter bei 18°.

Die Löslichkeit des wasserfreien Magnesiumsalzes in Wasser ist beträchtlich, es lösen sich z. B. glatt 3 g in 10 ccm H_2O.

Die Existenz eines Magnesiumsalzes erwähnt übrigens bereits *W. J. Young* (Proc. Roy. Soc. London [B] 81, 533, 1909) bei seinen grundlegenden Untersuchungen über die Hexosenphosphate. Er hat beobachtet, daß sich eine Lösung des Natriumsalzes beim Erhitzen mit Magnesiumcitrat trübt; isoliert und untersucht hat der Autor das Magnesiumsalz nicht.

Gleich dem Calcium- und Bariumsalz trübt sich eine wässerige Lösung von Magnesiumhexose-di-phosphat in der Siedehitze; doch scheidet sich dabei viel weniger festes Salz ab, als bei der Calcium- und Bariumverbindung. Durch Zusatz von Chlorammonium, das erfahrungsgemäß mit manchen Magnesiumsalzen additionelle Verbindungen bildet, kann man Lösungen des Magnesiumsalzes die Fähigkeit nehmen, sich in der Siedehitze zu trüben. Die chlorammoniumhaltigen Flüssigkeiten bleiben selbst in der Wärme vollkommen klar. Man kann die gleiche Erscheinung auch bei dem Kalksalz konstatieren, indem hier Chlorammonium ebenfalls die Abscheidbarkeit in der Wärme aufhebt.

Vermutlich wird sich das Magnesiumsalz gut zu physiologischen Versuchen eignen, da es einerseits löslicher als die Calciumverbindungen ist, andererseits auch nicht die Zersetzlichkeit der hexose-di-phosphorsauren Alkalien aufweist. Ähnliches gilt für die Magnesiumsalze verschiedener Phosphorsäureester.

Anhangsweise berichten wir über folgendes Experiment.

Das reine Calciumsalz kann zu Versuchen über die Acetylierung des Hexose-di-phosphats dienen. Übergießt man ein Gemenge von 5 g des Kalksalzes und 2,5 g wasserfreien Natriumacetats mit 30 g Essigsäureanhydrid, so erfolgt bei schwachem Anwärmen auf freier Flamme eine heftige Reaktion, bei der alles in Lösung geht. Nach dem Verdünnen mit Wasser scheidet sich die Acetylverbindung nicht ab, da sie vermutlich wegen Anwesenheit der Phosphorsäure-reste leicht löslich ist. In fester Form erhält man das Acetat, wenn man das Acetylierungsprodukt mit Benzol versetzt. Dabei fällt das essigsaure Natrium aus, das nach längerem Stehen abgesaugt werden kann; im Benzol bleibt die Acetylverbindung, die auf Zugabe von Petroläther in Flocken niedergeschlagen wird. Da sie bisher nicht oder nur in ganz kleinen Mengen kristallinisch gewonnen worden ist, so haben wir die Untersuchung der Substanz noch nicht zu Ende geführt.

Über Apozymase und Cozymase.
Zur Lehre von der Phosphorylierung.

Von

C. Neuberg und **A. Gottschalk.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

1.

Seitdem *A. Wróblewski*[1]) sowie *E.* und *H. Buchner* nebst *M. Hahn*[2]) die stimulierende Wirkung von Alkaliphosphaten beim Gärungsprozeß beobachtet hatten, ist der Einfluß von phosphorsauren Salzen auf den Ablauf der alkoholischen Zuckerspaltung dauernd Gegenstand der Forschung geblieben. Einerseits haben *A. Harden* und *W. J. Young*[3]) sowie *L. Iwanoff*[4]) gerade vor 2 Dezennien die Feststellung gemacht, daß es unter Mitwirkung der Hefe zur Bildung von Zucker-phosphorsäureestern, hauptsächlich von Hexose-di-phosphorsäure, kommen kann. Andererseits ist von *C. Neuberg* mit *E. Färber*, *J. Hirsch*, *E. Reinfurth* und *W. Ursum* 10 Jahre später gezeigt worden[5]), daß hinreichende Mengen alkalisch reagierender Phosphate den Eintritt der dritten Vergärungsform, die Zerlegung des Zuckers in Essigsäure, Weingeist, Kohlendioxyd und Glycerin, auslösen. Dieser Vorgang erscheint genügend durch die Erfahrung geklärt, daß die Aldehydmutase der Hefe im alkalischen Milieu stark begünstigt ist; indem sie das Gärungszwischenprodukt Acetaldehyd zur Dismutation bringt, geht der labile Gärungswasserstoff seines natürlichen Akzeptors verlustig und wird zu anderweitiger Betätigung, zur reduktiven Produktion von Glycerin veranlaßt. Hinsichtlich der Phosphorylierung blieb die Einsicht in die Bedingungen unbefriedigend, unter denen diese Esterbildung erfolgt. So wissen wir nicht, warum frische Hefen gar nicht oder nur

---

[1]) *A. Wróblewski*, Journ. f. prakt. Chem. [II] **64**, 1, 1901.

[2]) *E.* und *H. Buchner* sowie *M. Hahn*, Zymasegärung **1903**, 140.

[3]) *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Chem. Soc. **21**, 189, 1905.

[4]) *L. Iwanoff*, Trav. de la Soc. des Natural. Petersburg, **34**, 1905.

[5]) *C. Neuberg* und *E. Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, ebendaselbst **100**, 304, 1919; *C. Neuberg*, *J. Hirsch* und *E. Reinfurth*, ebendaselbst **105**, 307, 1920; *C. Neuberg* und *W. Ursum*, ebendaselbst **110**, 193, 1920.

spurenweise, nach Zusatz von Toluol oft mehr, zugefügtes Phosphat an Kohlenhydrate binden; unbekannt ist ferner, aus welchen Gründen Trockenpräparate und Mazerationssäfte von untergärigen Rassen praktisch quantitativ phosphorylieren, während Dauerpräparate von Oberhefen hierzu nicht oder nur in mäßigem Umfange befähigt sind[1]).

2.

Für die Aufhellung der Verhältnisse bot uns die Beobachtung einen Hinweis, daß die *Aceton-Präparate der* von uns geprüften deutschen und tschechischen *Oberhefen* (Germaniahefe, Oberhefe My, Oberhefe S & H) zugefügten Zucker nicht oder nur schwach zu vergären vermochten, aus Brenztraubensäure jedoch schnell und glatt Kohlendioxyd hervorgehen ließen. Sie verhielten sich also ebenso wie der früher von *C. Neuberg* und *L. Czapski*[2]) untersuchte Saft obergäriger Hefen. Da die carboxylatische Spaltung der Brenztraubensäure nicht an die Anwesenheit von Coferment geknüpft ist[3]), lag die Vermutung nicht fern, daß die Unvergärbarkeit des Zuckers durch Aceton-Oberhefen auf Mangel an disponiblem Coferment zu beziehen sei. In der Tat gelang es uns, durch Zusatz von Kochsaft aus untergäriger Hefe, der diesen Zymaseteil in reichlicher Menge enthält, dem *Acetonpräparat aus Oberhefe* ein gutes Vergärungsvermögen für Zucker zu verleihen. Selbst eine 4 Jahre lang im Institut aufbewahrt gewesene Aceton-Trockenhefe aus der deutschen obergärigen Rasse M konnte durch Beigabe von Kochsaft zur schnellen alkoholischen Zuckerspaltung instand gesetzt werden. (Siehe Tabelle I.)

Eine konzentrierte *Cozymaselösung* erhält man folgendermaßen: 200 g frische Unterhefe werden mit 100 ccm Wasser verrührt und auf dem Wasserbade bis auf 80° erwärmt. Dann kocht man auf dem Baboblech auf und verwendet die unter Abkühlung filtrierte Flüssigkeit.

Daß es sich bei der von uns regelmäßig erzielten Auffrischung einer solchen gärunwirksamen Aceton-Oberhefe durch Kochsaft um eine Cofermentwirkung handelt, nicht aber um den Effekt der im Kochsaft außerdem noch enthaltenen Gärungsaktivatoren (Biokatalysatoren) geht aus dem letzten Versuch der Tabelle I hervor. In diesem Falle war zu der *Aceton-Oberhefe* nicht der auf übliche Weise durch kurzes Erhitzen auf 100° erhaltene Kochsaft gefügt worden, sondern ein nach der Vorschrift von *H. Haehn* und *H. Schifferdecker*[4]) hergestellter

---

[1]) Siehe hierzu *C. Neuberg, E. Färber, A. Levite* und *E. Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 244, 1917; *H. v. Euler*, ebendaselbst **86**, 339, 1918; *C. Neuberg*, ebendaselbst **103**, 320, 1920.

[2]) *C. Neuberg* und *L. Czapski*, ebendaselbst **67**, 9, 1914.

[3]) *C. Neuberg* und *P. Rosenthal*, ebendaselbst **51**, 128, 1913; **61**, 171, 1914; **88**, 202, 1918; *A. Harden*, Biochem. Journ. **11**, 64, 1917.

[4]) *H. Haehn* und *H. Schifferdecker*, diese Zeitschr. **138**, 219, 1923.

sogenannter Schutzsaft; derselbe ist durch 8stündiges Kochen am Rückflußkühler von Cozymase befreit. Mit diesem Safte konnte keine Komplettierung bewirkt werden.

Tabelle I.

Ansätze: 1,0 g Aceton-Oberhefe, 10,0 ccm Flüssigkeit, 0,2 g Fructose, 2,0 ccm Toluol, Temperatur 34°.

Aceton-Oberhefe	Suspensions-flüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden										
		30′	40′	50′	60′	90	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h
My	Wasser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My	Kochsaft aus Unterhefe	2,1	4,0	6,3	8,2	13,3	17,8	23,9	28,0	31,8	—	55,6
Germania .	Wasser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Germania .	Kochsaft aus Unterhefe	1,8	4,2	6,7	9,1	—	18,7	26,0	31,2	33,9	—	57,1
S. & H. . .	Wasser	—	—	—	1,4	—	4,1	—	6,2	6,9	—	10,8
S. & H. . .	Kochsaft aus Unterhefe	—	4,6	—	7,3	9,7	13,6	20,8	24,4	29,2	32,1	50,3
Rasse M. . . (1920)	Wasser	—	—	—	2,7	—	6,6	—	9,2	—	10,5	14,4
Rasse M. . . (1920)	Kochsaft aus Unterhefe	8,9	—	—	13,3	16,7	19,1	22,6	24,4	27,5	30,9	52,6
My	Wasser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My	Schutzsaft aus Unterhefe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Auch *F. Hayduck* und *H. Haehn*[1]) haben bei Acetonpräparaten der von ihnen nach dem Lüftungsverfahren gewonnenen Spiritushefe geringe oder überhaupt keine Gärkraft festgestellt. Bei dem unter diesen Bedingungen erhaltenen Material war freilich das mangelhafte Gärvermögen nach Angabe der Autoren auf *Armut oder Einbuße an freier Zymase* zurückzuführen. Auf eine Zugabe von Kochsaft erreichte nämlich die Kohlendioxydproduktion der aus diesem Material bereiteten Acetonhefe innerhalb 24 Stunden höchstens 14 Proz. der in der Kontrolle (mit frischer Hefe gleicher Züchtung) entwickelten Menge von CO_2 und betrug in diesen Fällen nach 3 Tagen nicht mehr als 10 Proz. der theoretisch möglichen Ausbeute.

3.

Unsere Aceton-Präparate aus Oberhefen[2]), die Zucker nicht zu vergären vermochten, waren auch unfähig, zugefügtes Phosphat an

[1]) *F. Hayduck* und *H. Haehn*, diese Zeitschr. 128, 574, 1922.

[2]) Wir benutzen die Gelegenheit, Herrn Dr. *Albert v. May*, Direktor der Hatscheiner Zucker-, Spiritus- und Preßhefefabrik, ferner der Spiritus- und Preßhefefabriks-A.-G. Olmütz unseren verbindlichsten Dank für die Belieferung mit den benötigten Hefen auszusprechen.

Kohlenhydrat zu binden. (Siehe Tabelle II.) Nur die Acetonhefe S und H phosphorylierte in mäßigem Umfange, wie sie auch schwache Gärkraft aufwies. Durch den Kunstgriff der Cofermentbeigabe gelang es aber regelmäßig und sicher, obergärige Rassen zu einer fast vollständigen, d. h. 90 bis 95 proz., Phosphorylierung zu zwingen.

Tabelle II.

Ansätze: 3,74 g KH_2PO_4, 2,1 g $NaHCO_3$, 18,0 g Fructose, 85,0 ccm Wasser bzw. Kochsaft aus Unterhefe, 15,0 g Aceton-Oberhefe, 3,0 ccm Toluol. Temperatur 37°.

Aceton-Oberhefe	Zeitpunkt der Entnahme zur Phosphorsäurebestimmung	*Ansatz mit Wasser* In 5 ccm Gäransatz g		*Ansatz mit Kochsaft* In 5 ccm Gäransatz g	
		$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5
My	Versuchsbeginn	0,1462	0,0933	0,1618	0,1032
	nach 3½ Stunden	0,1386	0,0884	0,0172	0,0109
Germania .	Versuchsbeginn	0,1482	0,0945	0,1612	0,1028
	nach 3¼ Stunden	0,1410	0,0899	0,0496	0,0316
	„ 4¼ „	0,1417	0,0904	0,0104	0,0066
S. & H. . .	Versuchsbeginn	0,1676	0,1069	0,1720	0,1097
	nach 2 Stunden	0,1290	0,0823	—	—
	„ 3½ „	0,1228	0,0783	0,0092	0,0058

4.

Umgekehrt läßt sich — als einfacher Demonstrationsversuch — zeigen, daß *Acetonpräparate von Unterhefen*, die phosphorsaure Salze der zuckerhaltigen Suspensionsflüssigkeit innerhalb 2 bis 3 Stunden, manchmal noch rascher, quantitativ in organische Bindung überführen, durch *Auswaschen* des Coferments das Phosphorylierungsvermögen verlieren. Solche Versuche waren, soweit wir sehen, bisher nur mit Trockenhefe vorgenommen. (Siehe Tabelle III.)

Das Auswaschen gestalten wir einfach und wirksam durch folgende Maßnahmen:

1 Teil der Aceton- oder Trockenhefe wird in 20 Teile Leitungswasser eingetragen. Man rührt dann 40 Minuten mittels einer Turbine. Erfolgt diese Prozedur in einem geeigneten Zentrifugenbecher, so kann man durch Ausschleudern im gleichen Gefäß die Cozymase von der Restzymase trennen. Der ausgelaugte Hefensatz wird — immer im selben Behälter — von neuem mit Wasser aufgeschwemmt, damit mechanisch durchgerührt und wieder abzentrifugiert. Die gleiche Behandlung wird viermal wiederholt.

Durch Cofermentbeigabe kann man also nicht phosphorylierenden *Aceton-Oberhefen* gleichsam die Eigenschaften gut veresternder Aceton-Unterhefen verleihen, und letztere vermag man durch Entziehung der

Cozymase hinsichtlich ihres Phosphorylierungsvermögens Oberhefen äußerlich gleich zu machen.

Tabelle III.

Ansätze: 3,74 g KH_2PO_4 + 2,1 g $NaHCO_3$, 18,0 g Fructose, 85,0 ccm Wasser, 15,0 g Aceton-Unterhefe bzw. ausgewaschene Aceton-Unterhefe, 3,0 ccm Toluol. Temperatur 37°.

Aceton-Unterhefe	Zeitpunkt der Entnahme zur Phosphorsäurebestimmung	Ansatz mit gewöhnlicher Aceton-Unterhefe In 5 ccm Gäransatz g		Ansatz mit ausgew. Aceton-Unterhefe In 5 ccm Gäransatz g	
		$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5
Patzenhofer	Versuchsbeginn	0,1494	0,0953	0,1460	0,0931
	nach 2¾ Stunden	0,0128	0,0081	—	—
	„ 3¼ „	kein Niederschlag	0,0000	0,1422	0,0907
Radeberg .	Versuchsbeginn	0,1439	0,0918	0,1315	0,0839
	nach 2 Stunden	0,0126	0,0080	0,1310	0,0836
	„ 3 „	kein Niederschlag	0,0000	0.1420	0,0906
Patzenhofer	Versuchsbeginn	0,1455	0,0928	0,1275	0,0813
	nach 1 Stunde	0,1316	0,0839	—	—
	„ 2 Stunden	0,0058	0,0037	0,1298	0,0828
	„ 3 „	kein Niederschlag	0,0000	0,1370	0,0874
	„ 4 „	kein Niederschlag	0,0000	0,1372	0,0875

Durch die mitgeteilten Beobachtungen werden die in die Erscheinung tretenden Eigentümlichkeiten der *Aceton-Präparate der* von uns geprüften *Oberhefen* auf ein Manko an verwendungsbereitem Coferment zurückgeführt. Gleichzeitig erbringen die Versuche an neuem Material den Beweis dafür, daß die Phosphorylierung bzw. die sie einleitende Umwandlung des Zuckermoleküls, an die Anwesenheit von Coferment gebunden ist. Diese Ergebnisse[1]) stehen in Übereinstimmung mit einer kürzlich von *H. v. Euler* und *K. Myrbäck*[2]) gemachten Angabe, aus der man ableiten kann, daß die ausgewaschene *Trockenhefe untergäriger Rasse* gar nicht phosphorylierte[3]).

5.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei *Trockenpräparaten von Oberhefen*. (Siehe Tabelle IV.) Während untergärige Trockenhefen zugefügtes Phosphat vollständig mit anwesendem Zucker zum Ester

[1]) *A. Gottschalk* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **154**, 492, 1924.

[2]) *H. v. Euler* und *K. Myrbäck*, H. **139**, 15, 1924.

[3]) Die Erscheinung, daß ein solches Material bei steigendem Zusatz von Cozymase in zunehmendem Maße verestert, sei als **Euler-Effekt** bezeichnet. Wir befürworten die Anregung von *Euler* und *Myrbäck* (l. c.), statt „Coferment des Gärungsenzyms“ kurz *Cozymase* zu sagen. Die durch Dialyse, Ultrafiltration oder Extraktion von Cozymase befreiten Zymasepräparate seien *Apozymase* benannt. *Cozymase plus Apozymase bilden zusammen die komplexe gärtüchtige Zymase.*

zusammenschließen, phosphorylierten unsere *Oberhefen im getrockneten Zustande* nur etwa zu 10 bis 20 Proz. Auch durch Zugabe von Coferment (Kochsaft) ließ sich keine nennenswerte Änderung erzielen.

Tabelle IV.

Ansätze: 3,74 g KH_2PO_4, 2,1 g $NaHCO_3$, 18,0 g Fructose, 85,0 ccm Wasser bzw. Kochsaft aus Unterhefe, 15,0 g obergärige Trockenhefe, 3,0 ccm Toluol. Temperatur 37°.

Obergärige Trockenhefe	Zeitpunkt der Entnahme zur Phosphorsäurebestimmung	g P_2O_5 *Ansatz mit Wasser* (in 5 ccm Gäransatz)	g P_2O_5 *Ansatz mit Kochsaft* (in 5 ccm Gäransatz)
My	Versuchsbeginn	0,1062	—
	nach 3 Stunden	0,0955	—
	„ 4½ „	0,0979	—
S. & H. . .	Versuchsbeginn	0,1097	—
	nach 3½ Stunden	0,0804	—
	„ 4½ „	0,0832	—
Germania .	Versuchsbeginn	0,0961	0,1320
	nach 2½ Stunden	0,0787	0,1311
	„ 3½ „	0,0774	0,1096
My	Versuchsbeginn	0,1048	0,1247
	nach 3 Stunden	0,0846	0,1025
	„ 5 „	0,0843	0,1002

6.

Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, wenn man an der durch unsere Beobachtungen gestützten Annahme festhalten wollte, daß hinreichende Mengen von Cozymase ganz allgemein Phosphorylierung durch Trockenhefe ermöglichten. Weitere Untersuchungen führten zur Klärung dieser Verhältnisse und zu einer genaueren Präzisierung der am Prozeß der Zucker-Veresterung beteiligten Agentien.

Ansatz I.

a) 20 g *untergärige Trockenhefe* (Schultheiß-Patzenhofer) wurden in 120 ccm 20 proz. Rohrzuckerlösung eingerührt und 3½ Stunden bei 20° damit digeriert. Daraufhin wurde die zu dieser Zeit lebhafte Gärung durch Abkühlung des Ansatzes auf 0° tunlichst abgeschwächt, das Gärgut scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit zur möglichsten Befreiung von anwesenden Zellen filtriert. Brachte man nunmehr 15 ccm dieses zellfreien Saftes unter Zugabe von 1 ccm Toluol — diese Menge darf als hinreichend gelten, um eine Zelltätigkeit auszuschließen — in ein Gärröhrchen, so setzte bei 34° eine deutlich wahrnehmbare und gleichmäßig fortschreitende Gärung ein.

Diese durch die Gärtüchtigkeit des Saftes nachgewiesene Zymase kann nur aus abgetöteten Zellen des Trockenpräparats ausgetreten sein; denn lebende Hefezellen geben keine zymatischen Fermente an die Suspensionslösung ab.

b) *20 g obergärige Trockenhefe* (My) wurden in 120 ccm 20proz. Rohrzuckerlösung suspendiert; des weiteren verfuhren wir auf gleiche Art wie bei Ansatz a). Der gewonnene Saft wurde zu drei Proben benutzt:

α) 15 ccm Saft + 1 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°;

β) 15 ccm Saft + 0,5 g Fruktose + 1 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°;

γ) 10 ccm Saft + 5 ccm Kochsaft von Unterhefe + 1 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°.

In allen drei Ansätzen war keine Gärung nachweisbar, selbst nicht nach 24 Stunden. Da weder Kohlenhydrat-Mangel noch Cozymase-Armut hierfür verantwortlich gemacht werden kann (vgl. β und γ), so muß auf ungenügende Abgabe von Gesamtzymase bzw. von Apozymase seitens der *Trocken-Oberhefe* an die Außenflüssigkeit geschlossen werden.

Ansatz II.

a) 50 g Trockenhefe (My), 150 ccm Wasser, 2½ Stunden bei 37°, Filtration. Filtrat = Mazerationssaft M (p_H = 6,2).

α) 15 ccm Saft M + 1,25 g Glukose + 1,5 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°. Gärt nicht.

β) 10 ccm Saft M + 5 ccm Kochsaft aus Unterhefe + 1,25 g Glukose + 1,5 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°. Gärt schwach.

b) 50 g Trockenhefe (Germania), 150 ccm Wasser, 2½ Stunden bei 37°. Filtration. Filtrat = Mazerationssaft G (p_H = 6,0).

α) 15 ccm Saft G + 1,25 g Glukose + 1,5 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°. Gärt sehr schwach;

β) 10 ccm Saft G + 5 ccm Kochsaft aus Unterhefe + 1,25 g Glukose + 1,5 ccm Toluol im Gärröhrchen bei 37°. Gärt schwach.

Es gelang demnach nicht, aus *Trockenpräparaten der Oberhefen* My und Germania gut wirksame Mazerationssäfte zu bereiten. Auch Zugabe von Kochsaft änderte hieran wenig. Die Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß sich aus den Trocken-Oberhefen My und Germania Apozymase bzw. Zymase nicht oder nur in sehr beschränktem Umfange extrahieren läßt. Etwas abweichend verhielt sich die Trocken-Oberhefe S & H. Sie lieferte Mazerationssäfte von wechselnder Wirksamkeit; stets aber blieb die Gärkraft derselben erheblich hinter derjenigen von typischen Mazerationssäften aus untergärigen Arten zurück.

Es existieren nach Rasse und Züchtungsbedingungen Unterschiede bei den Oberhefen hinsichtlich des Verhaltens von Apo- und Cozymase. Manche Sorten stellen Übergangsformen zwischen Ober- und Unterhefen dar, ohne daß sich dieses in morphologischen Kennzeichen aus-

prägt. Zumeist zeigt aber obergärige Preßhefe ein biochemisches Verhalten, wie es in dieser Mitteilung beschrieben wird.

Im Zusammenhange mit diesen Untersuchungen haben wir mittels der Methylenblaumethode festgestellt, daß unsere Trocken-Unterhefen nur etwa 10 Proz. lebensfähige Zellen enthielten, während die von uns verwendeten Oberhefen im Trockenzustande einen 20- bis 45proz. Gehalt an lebenden Zellen aufwiesen. Wenn auch die Methylenblaumethode keine absolut genauen Zahlen gibt, da sich z. B. kranke oder absterbende Hefezellen, die keine Fortpflanzungsfähigkeit mehr besitzen, nicht färben, so leistet sie doch nach *W. Hennebergs*[1]) Ansicht bei sorgfältiger Technik gute Dienste zur Orientierung. Über ein exakteres und einfacheres Verfahren verfügen wir zurzeit nicht.

7.

Durch diese Ermittlungen ist dargetan, daß obergärige Trockenhefen nur in sehr beschränktem Umfange Zymase sowie Apozymase in die Suspensionsflüssigkeit entlassen. Hierfür können verschiedene Gründe geltend gemacht werden. *Hayduck* und *Haehn* haben (l. c.) auf die Zymasearmut von Oberhefen hingewiesen; Spiritushefen (Oberhefen) werden im Gegensatz zu untergäriger Bierhefe unter Lüftung auf Zellenvermehrung hin gezüchtet[2]). Hierdurch ist nach den Autoren die Hefe gezwungen, aus den Nährstoffen in erster Linie Plasma für die Fortpflanzung zu bilden; Zymase soll nur so viel entstehen, wie gerade zur Erhaltung notwendig ist. *H. Sobotka*[3]) zieht Fortfall eines zymaseloslösenden Apparats im Sinne *R. Willstätters* in Erwägung. Sichergestellt ist ferner der hohe Gehalt unserer *Trocken-Oberhefen* an lebensfähigen Zellen, und schließlich hat man sich der sehr festen Zellgrenzschicht der Oberhefen zu erinnern. Das auch in Gegenwart von Toluol geringfügige Phosphorylierungsvermögen der *Trocken-Oberhefen* läßt sich auf Grund der obigen Beobachtungen durch die Abwesenheit von Zymase bzw. Apozymase in der umgebenden Flüssigkeit erklären; Zugabe von Cozymase bewirkt in diesem Falle keine Steigerung der Phosphatbindung. Das besagt, daß zur Kohlenhydrat-Veresterung außer der Cozymase noch ein anderer Teil der Restzymase (Apozymase) erforderlich ist. In den *Acetonpräparaten* der Oberhefen, die nur abgetötete Zellen enthalten, ist dieser Zymasebestandteil in ausreichendem Maße vorhanden; es fehlt lediglich an Cozymase. In der Suspensions-

---

1) *W. Henneberg*, Gärungsbakteriol. Praktikum. Berlin 1909.

2) Hingegen wachsen z. B. die *englischen Oberhefen* bei der Bierbereitung wie untergärige Rassen unter „Luftabschluß" heran; so erklären sich die Unterschiede zwischen deutschen und englischen Oberhefen, welch letztere in den hier in Betracht kommenden Eigenschaften deutschen untergärigen Rassen nahestehen.

3) *H. Sobotka*, H. 134, 1, 1924.

flüssigkeit von frischen Hefezellen herrscht Mangel an beiden Zymasekomponenten (keine nachweisbare Phosphorylierung). In der umgebenden Flüssigkeit von *Trocken-Oberhefen* sind sie nur in sehr beschränktem Umfange enthalten (mäßige Phosphorylierung). Überall, wo Toluol hinzugefügt ist, kommt noch in Betracht, daß dieses Protoplasmagift die Plasmolyse begünstigt.

Tabelle V.

Ansätze: 1,0 g Trocken-Oberhefe, 10,0 ccm Wasser, 0,2 g Fructose, 2,0 ccm Toluol, Temperatur 34°.

Trocken-Oberhefe	Art der Vorbehandlung	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden									
		30′	40′	50′	60′	90′	2h	3h	4h	5h	24h
Germania	normal	7,9	—	—	16,1	—	24,9	29,6	34,4	—	42,3
„	6 mal ausgewaschen	—	—	—	11,5	15,1	19,7	24,8	29,0	33,4	43,2
My . . .	normal	9,0	—	—	18,7	—	36,8	45,1	47,5	—	49,6
My . . .	6 mal ausgewaschen	—	—	—	16,9	22,7	28,9	34,8	40,4	46,2	52,5
S. & H. .	normal	8,5	—	—	16,2	23,6	29,4	36,1	—	—	54,7
S. & H. .	6 mal ausgewaschen	2,9	—	—	8,2	12,4	15,8	19,2	—	—	34,1
S. & H. .	10 „ „	3,2	—	—	8,7	12,5	16,3	20,0	—	—	36,8

8.

In guter Übereinstimmung mit unseren bisherigen Befunden an *Trockenpräparaten von Oberhefen* und den gezogenen Schlußfolgerungen stehen die Ergebnisse der nachfolgenden *Auswaschversuche* an dem gleichen Material. (Siehe Tabelle V.) Während sich, wie *A. Harden*[1]) gezeigt hat, aus getrockneter Unterhefe [sowie aus englischer Aceton-Oberhefe[2])] das Coferment durch wiederholtes Wässern unschwer extrahieren und die Hefe hierdurch inaktivieren läßt, gelingt es im allgemeinen nicht, durch noch so intensives Auswaschen deutsche Oberhefen im Trockenzustande ihrer Cozymase zu berauben und sie so gärunwirksam zu machen. Selbst zehnmal ausgewaschene Trocken-Oberhefe gor kräftig.

Im Einklange mit dieser Erfahrung ist es nicht möglich, durch Zufügen des eingeengten *Waschwassers* von *Trocken-Oberhefe* eine extrahierte und so gärunwirksam gemachte *Aceton-Unterhefe* zu aktivieren. Wohl regeneriert *Kochsaft* von frischer Oberhefe sowie aufgekochte frische Oberhefe (als unfiltrierte Suspension) die durch Auslaugen inaktivierten Unterhefen-präparate. Hierdurch ist erwiesen, daß Oberhefen ein auf Unterhefen abgestimmtes Coferment enthalten. (Siehe Tabelle VI.)

---

[1]) *A. Harden*, Chem. Centralbl. **1913**, II, 1888; **1917**, II, 239.

[2]) Diese hat den Charakter der deutschen Unterhefen; vgl. die voraufgehende Anm. 2 auf S. 251 dieser Mitteilung.

Tabelle VI.

Ansätze: 1,0 g ausgewaschene Aceton-Unterhefe, 10,0 ccm Flüssigkeit, 0,2 g Fructose, 1,5 ccm Toluol. Temperatur 34°.

Hefenpräparat	Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Min. bzw. Stdn.					
		30′	2h	4h	15h	18h	24h
Ausgewaschene Acetonunterhefe	Wasser	0	0	0	0	0	0,7
ebenso	Bei 35° eingeengtes Waschwasser von untergäriger Trockenhefe	16,7	42,5	—	—	51,8	—
ebenso	Bei 35° eingeengtes Waschwasser von obergäriger Trockenhefe	0	0	0	1,6	—	2,1
ebenso	Kochsaft von frischer Unterhefe	—	—	45,9	—	53,2	—
ebenso	Kochsaft von frischer Oberhefe	—	—	42,2	—	50,5	—
ebenso	Aufgekochte frische Oberhefe unfiltriert, verdünnt mit Wasser 1 : 3	—	—	38,6	—	48,7	—

9.

Somit ergibt sich für das Phosphorylierungsvermögen der verschiedenen Hefenarten und -präparate folgendes:

1. Frische Hefen, gleich welcher Art, phosphorylieren zumeist nicht oder nur spurenweise. Zusatz eines Zellgiftes wie Toluol steigert die Veresterungsfähigkeit.

2. Trockenpräparate von untergärigen Hefen können zugefügtes Phosphat quantitativ in organische Bindung mit anwesenden Kohlenhydraten überführen. Durch Wasserextraktion büßen die typischen Trocken-Unterhefen gänzlich die Kraft zur Phosphorylierung ein. Zugabe von Cozymase (Kochsaft) stellt jene in Verlust gegangene Eigenschaft wieder her.

3. Trockenpräparate von obergärigen Rassen verestern den Zucker nur in mäßigem Umfange (Mangel an extrahierbarer Zymase bzw. austretender Apozymase). Zufuhr von Cozymase übt keinen Einfluß aus.

4. Aceton-Dauerpräparate von Unterhefen sind imstande, zugegebenes Phosphat vollständig mit anwesendem Kohlenhydrat zu vereinigen. Auslaugung mit Wasser erniedrigt diese Fähigkeit auf Null.

5. Aceton-Dauerpräparate von Oberhefen phosphorylieren für sich nicht oder schwach. Durch Beimischung von Kochsaft gelingt es, eine praktisch fast quantitative Veresterung des Zuckers zu erzwingen.

Das obige Tatsachenmaterial berechtigt zu dem Schlusse, daß die Phosphorylierung an die Gegenwart von Cozymase und eines weiteren,

vorab nicht näher definierten Zymasebestandteiles[1]) geknüpft ist. Fernerhin gestatten die nunmehr vorliegenden Beobachtungen, schärfer als dies bisher geschehen ist, zwischen einer provozierbaren und einer natürlichen, sich intermediär abspielenden Phosphorylierung zu unterscheiden[1]).

Die *sichtbare Beladung mit Phosphorsäure* vollzieht sich unter dem Einfluß von Aceton-Dauerhefe, von Trockenhefe, von Hefenpreß- und Mazerationssaft wie auch von frischer Hefe in Gegenwart eines Zellgiftes (Toluol oder Carbolsäure) in der Suspensionsflüssigkeit in quantitativem oder nahezu vollem Ausmaße dann, wenn Zucker, Phosphat, Cozymase und Apozymase bzw. Gesamtzymase in genügend innige Berührung treten, wie dies der eine von uns bereits früher formuliert[2]) hat. Eine *Ansammlung von Zymophosphat* findet also nur mit besonders hergerichteten Hefezubereitungen und bei Darbietung abnormer Mengen phosphorsaurer Salze sowie bei Herstellung eines Mediums statt, dessen p_H (= 6,4) mit dem Reaktionsoptimum der Phosphatese[3]) übereinstimmt. Da mit lebenden frischen Hefen, die normalerweise bei ausgesprochen saurer Reaktion wirken, kaum eine Anreicherung von Hexose-di-phosphat im Gärgut erfolgt, so muß man annehmen, daß die Phosphorylierung, wenn sie mit dem Gärakt unlösbar verknüpft ist, sich intrazellulär abspielt, indem im Zellinnern vorhandene Phosphat-ionen auch ohne besonderen Zusatz eines phosphorsauren Salzes in den Gärungsvorgang einbezogen und in entsprechendem Maße wieder frei werden. Somit ist die *extrazelluläre Anhäufung* von Zucker-phosphorsäureester von *C. Neuberg* und seinen Mitarbeitern[4]) nicht ohne Recht als ein unphysiologischer Prozeß bezeichnet, und zwar in dem Sinne, daß hier offenbar eine Wirkung entfesselter Enzymkräfte außerhalb der gewöhnlichen Koordination bei Anwesenheit unnatürlicher Quantitäten phosphorsaurer Salze zur Geltung kommt.

10.

Auch die tierische Zelle verfügt über ein Coferment. *O. Meyerhof*[5]) hat gezeigt, daß sich die Gärung eines Hefemazerationssaftes, dessen

[1]) Daß Cozymase allein die Veresterung von Hexosen mit zugegebenem Phosphat nicht ohne weiteres zu vollbringen vermag, geht aus folgendem Befunde hervor. Löst man Fruchtzucker in der entsprechenden Menge anorganischer Phosphatmischung auf und gibt reichlich Cozymase plus Toluol hinzu, so ist selbst nach Wochen keine Abnahme der durch Magnesiamixtur fällbaren Phosphationen zu konstatieren (Temperatur 34°). Vgl. hierzu die Versuche von *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **155**, 499, 1925.

[2]) *A. Gottschalk*, Wien. klin. Wochenschr. **1925**, Nr. 14.

[3]) *H. v. Euler* und *F. Nordlund*, H. **116**, 243, 1921.

[4]) Siehe Anm. 1 auf S. 245 und über die ganze Frage der Phosphorylierung in chemischer sowie physiologischer Hinsicht *C. Neuberg* in Oppenheimers Handbuch der Biochemie, 2. Auflage, Band **I**, S. 530 und Band **II**, S. 452–458, 1924.

[5]) *O. Meyerhof*, H. **101**, 165; **102**, 1, 1908.

Cozymase durch Ultrafiltration entfernt ist, durch Muskelkochsaft — analog wie durch Hefekochsaft — regenerieren läßt. Dieses animalische Coenzym ist in allen untersuchten Organen von Kalt- und Warmblütern aufgefunden worden, in größter Konzentration im Muskel. Es reaktiviert nicht nur die durch Auswaschen von Cozymase unterbundene alkoholische Zuckerspaltung, sondern auch die durch den gleichen Eingriff einer Extraktion mit Wasser erloschene Atmung von Hefe- und Muskelzellen. Diese Übereinstimmung des Coferments der Atmung mit der Cozymase der Gärung ließ vermuten, daß diejenigen Phasen beider Prozesse, bei denen es sich betätigt, nahe verwandt, möglicherweise identisch seien. Es ist uns gelungen, dieser Hypothese eine experimentelle Stütze zu geben. Durch die nachfolgenden Versuche wird gezeigt, daß *gärunwirksame und nicht phosphorylierende Aceton-Oberhefe* durch Zusatz von Kochsaft aus Kaninchenmuskulatur gärtüchtig wird und zugesetztes Phosphat zu 50 bis 60 Proz. an Kohlenhydrate bindet. Das Coferment der tierischen Zelle vollbringt also den gleichen eng umschriebenen Vorgang am Hexosenmolekül, die intermediäre Veresterung, wie die Cozymase der Hefe.

Tabelle VII.

Ansätze: 1,0 g ausgewaschene Aceton-Unterhefe, 10,0 ccm Flüssigkeit, 0,2 g Fructose, 1,5 ccm Toluol. Temperatur 34°.

Hefenpräparat	Suspensionsflüssigkeit	ccm CO_2 nach Minuten bzw. Stunden						
		30′	60′	90′	2h	3h	4h	18h
Ausgewaschene Aceton-Unterhefe	Wasser	0	0	0	0	0	0	0
ebenso	Kochsaft von untergäriger Trockenhefe	2,1	9,5	15,4	19,9	25,6	30,8	41,3
ebenso	Kochsaft von Kaninchenmuskulatur (Muskelbrei u. Wasser zu gleichen Teilen aufgekocht, filtriert)	2,9	11,2	17,3	19,8	23,4	29,4	36,5
ebenso	Kochsaft von Kaninchenmuskulatur	1,4	14,1	20,7	24,3	—	—	39,8
ebenso	Kochsaft von menschl. Mammacarcinom[1])	2,3	4,7	14,2	18,4	23,3	—	33,7
ebenso	Kochsaft von menschl. Uteruscarcinom[1])	3,7	8,4	13,5	16,6	—	33,1	40,2

[1]) Wir sind dem verstorbenen Direktor des klinischen Instituts für Frauenkrankheiten und Geburtshilfe an der Universität Berlin, Herrn Geheimrat *Bumm*, für die Überlassung des Krebsmaterials zu Dank verpflichtet.

In Tabelle VII sind die Resultate von vergleichenden Versuchen mitgeteilt, in denen ausgewaschene Aceton-Unterhefen durch Kochsäfte nicht nur von untergäriger Hefe, sondern auch von solchen aus tierischen Geweben (Kaninchenmuskulatur, bösartigen Geschwülsten) gärfähig gemacht worden sind.

Die herangezogenen tierischen Gewebe schließen demnach hinreichend Coferment ein, um die *Apozymase der Unterhefe* zu komplettieren.

Die Daten der Tabelle VIII zeigen sodann, daß *Muskelkochsaft nicht phosphorylierende Aceton-Oberhefe in den Stand setzt, zugefügtes Phosphat in einem Ausmaße*[1]) *von 50 bis 60 Proz. organisch mit Zucker zu verknüpfen.*

Tabelle VIII.

Ansätze: 3,74 g KH_2PO_4, 2,1 g $NaHCO_3$, 18,0 g Fructose, 85,0 ccm *Muskelkochsaft*[2]) (Kaninchen), 15,0 g Aceton-Oberhefe Germania[3]), 3,0 ccm Toluol. Temperatur 37°.

Aceton-Oberhefe	Zeitpunkt der Entnahme zur Phosphorsäurebestimmung	g $Mg_2P_2O_7$ in 5 ccm Gäransatz	g P_2O_5 in 5 ccm Gäransatz
Germania	Versuchsbeginn	0,1716	0,1095
	nach 2 Stunden	0,0936	0,0597
	„ 5 „	0,0785	0,0501
Germania	Versuchsbeginn	0,1624	0,1036
	nach 3½ Stunden	0,0737	0,0470
	„ 5½ „	0,0634	0,0405
Germania	Versuchsbeginn	0,1992	0,1271
	nach 3 Stunden	0,0789	0,0503
	„ 5 „	0,0700	0,0447

Die Versuche mit animalischen Kochsäften tun also dar, daß tierisches Coferment nicht allein die Cozymase der Hefe für eine alkoholische Zuckerspaltung ersetzen, sondern auch die Apozymase zur Phosphorylierung ergänzen kann. Man geht wohl nicht fehl, wenn man auch die in animalischen Zellen vorkommenden Phosphorylierungsprozesse mit der Betätigung dieses Cofermentes in Beziehung bringt.

---

[1]) Die mit Muskelkochsaft eintretende Veresterung von Zucker durch freiwillig nicht phosphorylierende Aceton-Oberhefe bleibt hinter der durch Cozymase aus Hefe bewirkten zurück; das beruht auf dem erwiesenermaßen geringeren Gehalt tierischer Gewebe an extrahierbarem Coferment.

[2]) Der Muskelkochsaft wurde durch Aufkochen von Muskelbrei in der gleichen Menge Wassers hergestellt, filtriert und alsdann bei 30° im *Faust-Heim*schen Apparat im Verhältnis 5 : 1 eingeengt.

[3]) Phosphoryliert ohne Cofermentzusatz praktisch nicht; vgl. Tabelle II.

Zur Frage nach der Beeinflussung der Wirkung von Medikamenten durch Lecithine. VI.

Von

D. M. Lawrow.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium des medizinischen Instituts in Odessa.)

(Eingegangen am 15. Juni 1925.)

Vorliegende Mitteilung dient als Fortsetzung unserer vorhergehenden Mitteilung V über dieselbe Frage[1]). In der Mitteilung V sind unsere Versuche über den Einfluß der Lecithine auf die akute Vergiftung von Kaninchen mit Morphium kurz beschrieben. Die Gabe von Lecithinen betrug 0,5 g pro 1 kg Körpergewicht. Eingeführt wurden die Lecithine intraperitoneal und in die Vena jugularis, und zwar vor dem Injizieren des Morphiums, das in Dosen von 0,2 g Morphii muriatici pro 1 g Körpergewicht angewandt wurde. Die Ergebnisse von sieben Versuchen haben gezeigt, daß die Lecithine bei besagter Anwendung die Totalwirkung des Morphiums abschwächen, was die entsprechenden Angaben von *J. Nerking* (1) und *E. Hanschmidt* (2) im allgemeinen genommen bestätigt. Dabei ist von uns konstatiert worden, daß die abschwächende Einwirkung der Lecithine in bezug auf das Morphium auch bei intraperitonealen, sogar 2 bis 4 Tage vor der Vergiftung gemachten Einspritzungen ziemlich bedeutend ausgedrückt ist. Bei der Ausführung der weiter unten beschriebenen Versuche interessierte uns vorwiegend die Wirkung der Lecithine bei ihrer wiederholten subkutanen, vor der Morphiumanwendung gemachten Einverleibung ebenso wie der Einfluß dieser Lipoide auf Morphiumvergiftung bei nachfolgendem, d. h. nach dem Vergiften vorgenommenen Injizieren derselben in die Venen (in die V. jugularis). Die Versuche wurden hauptsächlich an Kaninchen, teils auch an Hunden ausgeführt. Morphium wurde in verhältnismäßig bedeutenden Dosen verwendet. Die mit Morphium vergifteten Tiere wurden während

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 177, 1924.

des Versuchs zwecks ihrer Beobachtung in einem isolierten Zimmer gehalten. Die Lecithine wurden von mir frisch aus Eigelb gewonnen und durch wiederholte Fällung aus Ätherlösung mittels Aceton gereinigt.

Die Morphium- und Lecithindosen werden pro 1 kg Körpergewicht gerechnet. In *Nerkings* Versuchen wurde Morphium muriaticum den Kaninchen zu 0,03 bis 0,04 pro Kilogramm, den Hunden etwa 0,015 eingeführt; in *Hanschmidts* Versuchen bekamen die Hunde 0,01 bis 0,015 pro Kilogramm. Unsere Versuche lassen sich in vier Gruppen einteilen:

1. Versuche mit vorhergehender Einverleibung der Lecithine subkutan.
2. Versuche mit vorhergehendem Injizieren der Lecithine intraperitoneal.
3. Versuche mit nachfolgender Einführung der Lecithine intraperitoneal.
4. Versuche mit nachfolgender Einspritzung der Lecithine in die Vena jugularis.

Die Tiere, die zu diesen Versuchen verwandt wurden, waren frisch, d. h. sie wurden keinen anderen Vergiftungen ausgesetzt.

1. Versuche mit vorhergehender subkutaner Einführung der Lecithine.

Versuche 20 und 20a.

Ein junges, frisches Hündchen, Männchen, Körpergewicht = 4,5 kg, bekam Morphium muriaticum in der Gabe = 0,02 g pro 1 kg Körpergewicht. 7 Tage nach dem Kontrollversuch (Nr. 20) schritt man zu der Einführung der Lecithine, subkutan täglich 0,1 g in der Form einer 10proz. Emulsion, was 1 Woche dauerte. Am siebenten Tage wurde Morphium gesondert einverleibt (Versuch 20a).

Die Protokolle dieser Versuche wie auch aller übrigen, werden weiter unten nur in wesentlichen Auszügen angeführt. Darin werden der ursprüngliche Zustand der Tiere und die wichtigsten Veränderungen, die in ihrem Allgemeinzustande statthatten, angegeben, wobei alles das, was unverändert blieb, des weiteren im Protokolltexte nicht mehr erwähnt wird.

Versuch 20 (Kontrolle).	*Versuch 20a (Lecithine).*
30 Minuten nach der Einführung des Morphiums: das Tier liegt auf dem Bauch fast unbeweglich, schläft; der Kopf liegt seitwärts auf dem Boden. Die Augen sind geschlossen, das Maul etwa halb geöffnet. Atmung 15 in der Minute, tief, gleichmäßig. Die Schmerzreflexe sind schwach, das Bewußtsein ist verdunkelt. Bisweilen schlägt das Tier die Augen ein wenig auf und hebt den Kopf.	Das Tier liegt fast unbeweglich auf der Seite, der Kopf auf dem Boden. Die Augen sind geschlossen oder halb geschlossen. Atmung 18, tief, etwas unregelmäßig. Die Schmerzreflexe sind schwach. Bisweilen fährt es zusammen, bisweilen winselt es schwach. Das Bewußtsein ist verdunkelt.

Nach 3 Stunden: Atmung 10 bis 12, etwas unregelmäßig im Rhythmus. Dann und wann Zuckungen der Hinterbeine.	Atmung 12 bis 14. Bisweilen bewegt sich das Tier von selbst, die Hinterbeine etwas einknickend, desgleichen bei schwacher Beunruhigung.
Nach 4 Stunden: Atmung 15, stoßweise, tief.	Atmung 18, rhythmisch regelmäßig. Oft läuft das Tier hin und her, von selbst und bei leichter Berührung mit der Hand. Die Schmerzreflexe stellen sich wieder her; das Zusammendrücken des Schweifes mit den Fingern veranlaßt das Tier, sich umzuwenden und aufzustehen. In den Korridor des Laboratoriums gebracht, läuft es dort frei herum, hin und her taumelnd.
Nach 6 Stunden: Liegt auf der Seite, schläft oder schlummert tief.	Liegt auf dem Bauche, hält den Kopf gerade, manchmal ihn auf die Seite neigend. Leichtes Schlummern. Läuft im Korridor flink, fast normal.
Nach 10 Stunden: Bewegt sich sehr wenig, nur durch die Hand beunruhigt.	Folgt richtig dem Rufe.
Nach 12 Stunden: Macht, auf die Beine gestellt, ein paar Schritte im Zimmer und legt sich hin.	Hat ein paar Stückchen Fleisch gefressen. Nach einigem Hin- und Herlaufen im Korridor, kommt das Tier von selbst in das Zimmer, wo der Versuch angestellt wird, zurück.

Aus dem Protokoll des Versuchs 20a ist also ersichtlich, daß Lecithine bei unserem Versuchstier eine ziemlich beträchtliche abschwächende Beeinflussung der toxischen Wirkung von Morphium ausübten.

Versuche 18 und 18a.

Frisches Hündchen von 7,8 kg Körpergewicht, sehr nervöses Weibchen. Morphium wurde subkutan zu 0,04 g verabreicht. Im übrigen ist die Versuchsanordnung genau die, wie in den Versuchen 20 und 20a.

Versuch 18.	*Versuch 18a.*
Nach 1 Stunde: Das Tier ist sehr erregt. Es läuft im Zimmer umher, wobei es sich jede 15 bis 20 Schritte schwerfällig niederläßt, fast auf den Bauch fallend, und so 30 bis 40 Sekunden und länger (bis zu einigen Minuten) liegen bleibt. Atmung ist beschleunigt, Bewußtsein vollständig verdunkelt. Das Tier ist sehr schreckhaft,	Dasselbe, mit Ausnahme von folgendem: Läßt sich streicheln, liegt beim Streicheln ruhig. Heult schwach und selten, läuft nicht so erregt umher, wie in Versuch 18.

läßt nicht zu sich heran, läßt sich nicht streicheln u. a. Das Maul ist ein wenig geöffnet, die Zungenspitze hängt heraus. Fällt beim Liegen auf die Seite um.	
Nach 4 Stunden: Läßt sich häufiger und schwerfälliger auf längere Zeit nieder, stöhnt und winselt nicht sehr laut, fast ununterbrochen. Fällt oft auf die Seite um, schließt die Augen und verfällt in Schlummer.	Läßt sich auf den Bauch nieder, nicht schwerfällig, ohne mit den Füßen anzuschlagen. Fällt auf die Seite nur selten um, Maximum auf ½ bis 1 Minute. Die Augen sind offen, schlummert gar nicht. Irgendwelche Schreckhaftigkeit ist nicht wahrnehmbar, liegt ruhig, wenn es gestreichelt wird. Winselt leise, schwach.
Nach 6 Stunden: Liegt oft auf dem Bauche, sich auf die Seite neigend. Schlummert mit halb geschlossenen oder geschlossenen Augen. Geht im Zimmer wenig herum. Legt sich schwerfällig nieder. Ist träge, schläfrig.	Geht ruhig im Zimmer umher, sich selten auf 30 bis 40 Sekunden auf den Bauch niederlassend, fast normal, nicht schwerfällig. Kauert sich manchmal nieder. Die Augen sind offen, schlummert nicht.
Nach 10 Stunden: Bald sitzt das Tier, bald liegt es auf dem Bauche, auf die Seite umfallend.	Im allgemeinen wie oben.

In Versuch 18 hat sich der Einfluß der Lecithine nicht stark geäußert, wohl deshalb, weil die Morphiumdose verhältnismäßig ziemlich groß war. Doch waren bei diesem Versuche sowohl die Periode der Morphiumerregung als auch die folgende Periode der Morphiumprostration deutlich schwächer ausgedrückt.

Versuche 16, 16a und 16b.

Frischer Hund, Männchen, Körpergewicht = 4,7 kg, jung, ruhig, heiter. Morphium muriaticum wurde zu 0,06 g pro 1 kg eingeführt. Die Versuchsanordnung ist im allgemeinen dieselbe wie bei den vorhergehenden Versuchen. Bei dem Versuche 16a wurden die Lecithine zu 0,05 g, und bei Versuch 16b zu 0,1 g pro 1 kg gegeben.

Die durch eine für Hunde große Dose Morphium muriaticum wie 0,06 g pro 1 kg verursachte Vergiftung war, wie das nachstehende Versuchsprotokoll zeigt, scharf ausgedrückt.

Versuch 16 (Kontrolle).

Nach 45 Minuten, das Tier schläft, auf dem Bauche liegend, den Kopf auf dem Boden. Dann und wann stellt es sich auf die Beine und bewegt sich ein wenig, unsicher, die Hinterbeine schleppend, mit dem Bauche den Boden berührend. Das Maul ist ein wenig geöffnet, die Zunge hängt etwas heraus. Bei Geräuschen fährt es schwach zusammen, wobei es zuweilen den Kopf ein wenig hebt. Atmung 24, gleichmäßig. Die Schmerzreflexe sind schwach, das Bewußtsein verdunkelt. Nach 6 bis 7 Stunden dasselbe,

der Schlaf aber geht in Schlummer über. Nach 9 Stunden schlummert das Tier immer noch, liegt auf der Seite mit angeschmiegtem Kopfe; geht von einem Platz zum anderen, die Hinterbeine schleppend. Die Augen sind bald geschlossen, bald halb geschlossen oder offen. Bei fortgesetzter Beobachtung, die 3 Stunden währte, waren keine besondere Veränderungen im Allgemeinzustande zu konstatieren. Am nächsten Morgen ist das Tier schreckhaft, geht unsicher, die Hinterbeine einknickend; nimmt keinen Fraß.

Versuch 16a (mit Lecithinen).

Nach 6 Stunden rückt das Tier schon ziemlich oft von einem Platz zum anderen. Nach 8 Stunden schlummert es schon nicht, die Augen sind offen, oft läuft es im Zimmer ziemlich frei umher, folgt dem Ruf sicher und richtig. Nachdem man es in den Korridor des Laboratoriums gelassen hat, läuft es dort flink und sicher herum. Das Bewußtsein ist teilweise nicht klar. Liegt häufig auf dem Bauche, manchmal auf kurze Zeit sich auf die Seite legend. Fraß nimmt es nicht. Dieser Zustand dauert weiter 2 Stunden an. Am anderen Tage ist das Tier lebhaft, keine Spur von Schreckhaftigkeit, bewegt sich normal, frißt gern.

Versuch 16b (mit Lecithinen).

7 Stunden nach der Einverleibung von Morphium bewegt sich der Hund im Zimmer, nachdem er auf Anrufen durch den Korridor, die Hinterbeine etwas einknickend gelaufen kam. Leichtes Kneifen der Haut mit den Fingern lenkt seine Aufmerksamkeit auf sich. Die Augen sind offen, das Tier schlummert wenig, dreht den Kopf beim Anrufen um und sieht den Rufenden an. Zuweilen liegt es auf dem Bauche, selten auf der Seite. Nach 8 Stunden bewegt es sich auf Anrufen im Zimmer, läuft im Korridor herum, wenig wankend, ohne die Beine einzuknicken. Fraß nimmt es nicht. Das Bewußtsein ist teilweise nicht klar. Am nächsten Tage verhält sich das Tier am Morgen normal, ist lebhaft, schmeichelt sich an.

Folglich war der bei den Versuchen 16a und 16b sich kundgebende abschwächende Einfluß der Lecithine auf Morphium durchaus wahrnehmbar, ziemlich groß, besonders bezüglich der Morphiumwirkung auf die motorische Nervensphäre.

Ähnliche Versuche wurden von uns auch an Kaninchen ausgeführt. Speziell an fünf einzelnen Kaninchen angestellte Versuche zeigten uns, daß eine einmalige Einführung von Morphium bei den Kaninchen bei diesen gar keine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber diesem Alkaloid entwickelt, was bei nachfolgenden Morphiumeinspritzungen statthätte. Die Einführung der Lecithine geschah auf dieselbe Weise wie bei den Hunden. Man begann damit nämlich 1 Woche nach der Morphiumeinspritzung bei dem Kontrollversuche und setzte sie 1 Woche fort; den letzten Lecithintag wurde Morphium apart eingespritzt. Auch bei Versuchen an Kaninchen wurde Morphium muriaticum in verhältnismäßig bedeutenden Dosen angewandt. Wie stark Morphium, in Dosen von 0,2 g Morphii muriatici verabreicht — die geringsten bei den in Rede stehenden Versuchen —, auf Kaninchen einwirkt, das ist aus Tabelle I zu ersehen. In dieser Tabelle werden die hauptsächlichen Angaben über den Allgemeinzustand der Kaninchen, denen bei den Versuchen 19, 21, 24 und 25 zu 0,2 g Morphii muriatici verabreicht wurde, mitgeteilt.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Anzahl der Kaninchen	Allgemeinzustand der Tiere
19	3	Nach 7 Stunden: ein Tier bewegt sich nicht, zwei rücken selten ein wenig träge ein paar Schritte weiter. Alle liegen platt auf dem Boden, schlafen, schwache Schmerzreflexe.
21	3	Nach 6 Stunden: alle liegen platt auf dem Boden, bewegen sich sehr wenig, schwache Schmerzreflexe. Ein Tier bewegt sich nicht bei der Berührung mit der Hand, läßt sich auf die Seite legen und verbleibt so 3 bis 4 Minuten und auch länger. Zwei machen, wenn sie beunruhigt werden, schwach, träge ein paar Schritte.
24	3	Nach 7 Stunden: liegen geduckt, bewegen sich nicht, schwache Schmerzreflexe, schlummern, schlafen. Werden sie mit der Hand beunruhigt, so bewegen sie sich ein wenig Ein Kaninchen †.
25	1	Nach 7 Stunden: liegt platt, bewegt sich sehr wenig und träge. Schwache Schmerzreflexe, schläft — schlummert.

Nachstehende Versuche sind hier in extenso beschrieben; angegeben werden nur die im Allgemeinzustande des Tieres vor sich gehenden Veränderungen. Das übrige wird als unverändert bleibend aufgefaßt.

Versuche 8 und 10.

Bei diesen Versuchen wurden zwei Kaninchen benutzt; ein junges Nr. 1 und ein erwachsenes Nr. 2. Salzsaures Morphium wurde zu 0,3 g verabreicht — eine verhältnismäßig große Dosis. Die Lecithine wurden täglich zu 0,1 g einverleibt. Nach Einführung von 0,1 × 7 g Lecithin bei dem Kaninchen Nr. 1 erwies sich die Abschwächung der Vergiftung etwas schwach (junges Tier!). Bei Kaninchen Nr. 2 wurde aber folgendes befunden:

Versuch 8 (Kontrolle).	*Versuch 10.*
Nach 30 Minuten: Atmung 12 bis 16, sehr oberflächlich; liegt hart mit Bauch und Kopf am Boden, läßt sich leicht flach ausbreiten und auf die Seite auf 2 bis 3 Minuten legen. Bewegt sich selten, dabei sehr wenig und sehr träge. Schmerzreflexe (Ohren, Schweif) sind schwach. Schläft — schlummert; die Augen sind halb geschlossen.	Atmung 18 bis 22, oberflächlich. Läßt sich nicht auf die Seite oder platt ausgebreitet hinlegen. Schmerzreflexe sind etwas schwach Das übrige siehe Kontrolle.
Nach 1½ Stunden: Atmung 14 bis 20, oberflächlich und ungleichmäßig. Allgemeine häufige Zuckungen.	Bewegt sich im Zimmer ziemlich häufig und munter. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach. Atmung 24 bis 32.
Nach 4 Stunden: Dasselbe.	Dasselbe, d. h. besagter Allgemeinzustand bleibt ohne Veränderung.
Nach 8 Stunden: Bewegt sich sehr selten, wenig und träge; läßt sich ohne Widerstand auf die Seite legen und verbleibt so 1 bis 2 Minuten.	Dasselbe.

Der Versuch wurde an denselben Kaninchen nach 2 Wochen wiederholt. Die Ergebnisse dieses Versuchs waren im allgemeinen dieselben wie bei dem Versuche 10.

Versuche 13, 15 und 15a.

Bei dem Versuche 13 bekamen drei Kaninchen subkutan zu 0,35 g morph. mur. pro 1 kg Körpergewicht. Die Vergiftung trat scharf hervor, so daß die Tiere nach 7 Stunden noch hart mit Bauch und Kopf am Boden lagen, noch schliefen oder tief schlummerten, sich nicht weiter bewegten u. a. Nach 1 Woche begann die subkutane Einführung der Lecithine zu 0,05 g pro 1 kg Körpergewicht, die 7 Tage dauerte, wonach eine Morphiumvergiftung folgte (Versuch 15). Die Lecithine beeinflußten diese Vergiftung schwach; die Beobachtung dauerte 9 Stunden. Nach Verlauf von 2 Wochen wurde der Versuch wiederholt, verabreicht wurden 0,1 g Lecithine pro 1 kg. Auch bei diesem Versuche (15a) erwies sich der Einfluß dieser Lipoide auf die Wirkung des Morphiums schwach: die Morphiumgabe war groß!

Versuche 17, 17a und 17b.

Zu diesem Versuche wurden zwei erwachsene Kaninchen verwandt. Bei dem Versuche 17 (Kontrolle) wurden 0,25 g Morph. mur. subkutan eingeführt, die Beobachtung dauerte 8 Stunden. Die Vergiftung war ziemlich stark. Nach 6 Stunden sind die Kaninchen noch sehr apathisch, schlafen — schlummern, liegen geduckt, bewegen sich immer noch sehr wenig, die Schmerzreflexe sind sehr schwach. Nach 7 Tagen bekamen die Kaninchen während 1 Woche täglich subkutan 0,05 g Lecithine, worauf eine zweite Morphiumvergiftung vorgenommen wurde (Versuch 17a). 1 Woche nach dem Versuche 17a wurde eine genau solche Einführung von Lecithinen zu 0,1 g unternommen, die auch 7 Tage dauerte, worauf gleichfalls (wie oben) die dritte Vergiftung folgte (Versuch 17b).

Der Versuch 17b wurde nur an einem Kaninchen ausgeführt, da ein Versuchstier, wie es sich nach Vollendung des Versuchs 17a herausstellte, krank war. Das Tier wurde getötet und obduziert; bei ihm wurde akute Entzündung der rechten Lunge mit Pleuritis und eiternde Pericarditis festgestellt.

Versuch 17 (Kontrolle).	*Versuch 17b (Lecithine).*
Nach 2 Stunden: Atmung 24; liegt flach am Boden. Das Tier bewegt sich sehr wenig und selten, träge, läßt sich auf 2 bis 3 Minuten platt hinlegen. Die Schmerzreflexe sind schwach, die Augen halb geschlossen, schläft — schlummert.	Sitzt niedergeduckt. Atmung 32 bis 36, gleichmäßig. Bewegt sich nicht selten ein wenig im Zimmer, den Boden beschnuppernd. Läßt sich weder auf die Seite, noch flach ausgestreckt hinlegen. Beim Zusammendrücken des Schwanzes mit den Fingern geht es weg. Die Augen sind offen, schlummert wenig.
Nach 5 Stunden: Bald liegt das Tier, bald sitzt es. Läßt sich nicht platt ausgebreitet oder auf die Seite hinlegen.	Sitzt, bewegt sich oft normal im Zimmer, schlummert nicht. Hält den Kopf normal, die Augen sind offen. Die Schmerzreflexe sind fast normal.
Nach 8 Stunden: Bewegt sich träge, selten und wenig.	— — —

Die toxische Wirkung des Morphiums erwies sich also bei dem Versuche 17b bedeutend abgeschwächt durch die Lecithine.

Versuche 19 und 19a.

Die Versuchsanordnung ist im allgemeinen dieselbe, wie bei den vorhergehenden Versuchen. Morphium muriaticum wurde zu 0,2 g, die Lecithine zu 0,1 g im Laufe von 6 Tagen eingeführt. Die Beobachtungen dauerten je 14 Stunden. Verwandt wurden zwei Kaninchen.

Versuch 19 (Kontrolle).	*Versuch 19a (Lecithine).*
Kaninchen Nr. 1.	
Nach 2 Stunden: Atmung 32, liegt hart am Boden, bewegt sich nicht fort. Die Schmerzreflexe sind schwach. Leichtes Aufzucken des ganzen Körpers. Schläft — schlummert, die Augen sind halb geschlossen.	Bewegt sich selbständig ein wenig im Zimmer umher. Bei mäßiger Beunruhigung (beim Versuche, es auf die Seite oder platt ausgebreitet hinzulegen) läuft es ziemlich schnell weg. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach. Bisweilen schlummert es mit halb geschlossenen Augen.
Nach 4 Stunden: Bisweilen bewegt das Tier den Kopf von Seite zu Seite. Bewegt sich wenig, selten und träge.	Bewegt sich oft selbständig im Zimmer. Beim Zusammendrücken des Schwanzes oder des Pfötchens mit den Fingern geht es ziemlich rasch weg.
Nach 8 Stunden: Bei Beunruhigung mit den Händen (Versuche, es auf die Seite zu legen u. dgl.) bewegt es sich wenig (auf einige Schritte), träge.	Sitzt normal, schlummert nicht; die Augen sind offen. Geht im Zimmer flink umher.
Nach 11 Stunden: Sitzt niedergeduckt, die Augen sind offen.	Dasselbe.
Kaninchen Nr. 2.	
Nach 2 Stunden: Atmung 18, liegt hart am Boden, läßt sich auf 1½ bis 2 Minuten auf die Seite, auf 2 bis 2½ Minuten platt ausgebreitet hinlegen. Die Schmerzreflexe sind schwach. Selten bewegt sich das Tier ein wenig, träge, sowohl von selbst als auch dann, wenn es beunruhigt wird. Schläft, schlummert, die Augen sind halb geschlossen.	Atmung 24, sitzt niedergeduckt. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach. Schlummert, die Augen sind offen. Bewegt sich von selbst selten, beunruhigt, entfernt es sich ziemlich fix. Läßt sich nicht auf die Seite oder platt ausgebreitet hinlegen.
Nach 4 Stunden: Läßt sich auf die Seite legen und bleibt so ½ bis 1 Minute.	Dasselbe.
Nach 8 Stunden: Atmung 24.	Sitzt geduckt, schlummert nicht. Von selbst bewegt sich das Tier etwas zu wenig.
Nach 12 Stunden: Im allgemeinen fast dasselbe.	Besondere Veränderungen sind nicht wahrnehmbar.

Bei besagten Versuchsverhältnissen war der Einfluß der Lecithine auf die Intoxikation des Kaninchens Nr. 1 ziemlich bedeutend; auf die des Kaninchens Nr. 2 aber obwohl deutlich wahrnehmbar, so doch etwas schwach.

In Tabelle II sind die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Tiere	Anzahl der Tiere	Salzsaures Morphium pro 1 kg	Lecithine pro 1 kg	Die Beeinflussung der Wirkung des Morphiums durch Lecithine
20a	Hund	1	0,02	0,1 × 7	bedeutende Abschwächung der Wirkung von Morphium
18a	"	1	0,04	0,1 × 7	etwas schwache
16a	"	1	0,06	0,05 × 7	bedeutende
16b	"	1	0,06	0,1 × 7	bedeutende
10	Kaninchen	2	0,3	0,1 × 7	1. etwas schwache, 2. bedeutende
15	"	3	0,35	0,05 × 7	nicht wahrnehmbar
15a	"	3	0,35	0,1 × 7	nicht wahrnehmbar
17a	"	2	0,25	0,05 × 7	schwache
17b	"	1	0,25	0,1 × 7	bedeutende
19a	"	2	0,2	0,1 × 6	1. bedeutende, 2. etwas schwache

Tabelle II zeigt, daß

1. die vorhergehende, wiederholte, subkutane Einverleibung der Lecithine auf die allgemeine toxische Wirkung des Morphiums bei Kaninchen und Hunden einen abschwächenden Einfluß ausüben kann. Diese Wirkung tritt bei Hunden offenbar häufiger und bedeutender hervor als bei Kaninchen.

2. Bei der Verwendung von beträchtlichen Morphiumdosen, wie z. B. 0,35 g bei den Kaninchen, beeinflussen die weiter oben angegebenen Lecithingaben die in Rede stehende Intoxikation, in den besagten Grenzen der Beobachtungszeit wenigstens, nicht (s. Versuche 15 und 15a).

3. Der zu untersuchende Einfluß der Lecithine hängt gewissermaßen auch von der Individualität des Tieres ab (s. Versuche 10 und 19a).

Eine derartige Anwendung der Lecithine sollte bei chronischer Morphiumvergiftung auch des Menschen durchgeprüft werden.

2. Vorhergehende Einverleibung der Lecithine in die Bauchhöhle.

In unserer vorigen Arbeit[1]) haben wir darauf hingewiesen, daß die vorhergehende Einführung der Lecithine bei Kaninchen, nämlich intraperitoneal, unseren Versuchen gemäß die toxische Wirkung des Morphiums scharf abschwächt. Hier werden einige ähnliche Versuche beschrieben, wobei in zwei Versuchen mit fünf Kaninchen geringere Lecithinmengen angewandt wurden als bei den Versuchen von 1924.

Den Kaninchen wurde Morphium muriaticum zu 0,2 g pro 1 kg, dem Hunde zu 0,02 g pro 1 kg subkutan eingeführt. Lecithine wurden in der Form einer 10proz. Emulsion (die Dosis wird auch pro 1 kg berechnet) injiziert. Die Lecithingaben werden auch pro 1 kg gerechnet.

Versuche 19 und 19c.

Dem Kaninchen wurden 2 Tage hintereinander Lecithine zu 0,2 g pro 1 kg in die Bauchhöhle eingeführt. Am dritten Tage wurde Morphium injiziert, (Versuch 19c), angestellt 2 Wochen nach dem Kontrollversuche.

[1]) Diese Zeitschr. 150.

Versuch 19 (Kontrolle).

Nach 3 Stunden: Liegt hart am Boden, schläft — schlummert, bewegt sich fast nicht; die Schmerzreflexe sind schwach. Läßt sich auf 1 bis 1½ Minuten platt ausgebreitet hinlegen. Die Augen sind halb geschlossen. Atmung 14.

Nach 7 Stunden: Atmung 18 bis 22. Bewegt sich selten, träge, wenig.

Nach 10 Stunden: Bewegt sich bisweilen selbständig träge, ein wenig; bewegt sich auch, wenn es beunruhigt wird.

Versuch 19c.

Atmung 24 bis 30; bewegt sich nicht selten selbständig im Zimmer umher. Bei Versuchen, das Tier auf die Seite zu legen, sträubt dieses sich normal. Wird es mit der Hand beunruhigt, so geht es ziemlich fix weg. Schlummert nicht, die Augen sind offen. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach.

Sitzt normal. Bewegt sich oft selbständig. Sitzend regt es den Kopf, beschnuppert den Boden. Beim Aufdrücken auf den Schwanz oder die Pfötchen geht es schnell weg.

Geht fix im Zimmer umher; frißt Apfelschalen, ein wenig Hafer.

Der Versuch zeigt also eine bedeutend abschwächende Wirkung der Lecithine auf die Intoxikation.

Versuche 28 und 28a.

Drei Kaninchen wurde 2 Tage nacheinander je 0,1 g Lecithin injiziert; am dritten Tage bekamen sie Morphium. Der Einfluß der Lecithine trat schwach hervor. Nach 1 Monat bekamen zwei dieser Kaninchen 0,2 g Lecithin und 4 Stunden hernach Morphium subkutan (Versuch 28), Schon nach 3 Stunden bewegen sich diese beiden Kaninchen selbständig ziemlich fix, obwohl sie das nicht oft tun und meistens in liegender Stellung verbleiben. Sie liegen mit offenen Augen, schlummern wenig. Nach 6 Stunden bewegen sie sich selbständig häufig, jedoch etwas mehr träge als im Normalzustand. Folglich kam bei diesem Versuche der Einfluß der Lecithine auf die Wirkung des Morphiums zum Vorschein, jedoch nur in mittlerem Grade.

Versuch 20 und 23a.

Einem Hunde wurden Lecithine zweimal je 0,2 g, und zwar 2 Tage und 1 Tag vor der Einführung des Morphiums injiziert.

Versuch 20 (Kontrolle).

Nach 2 Stunden: Das Tier liegt auf dem Bauche, stellt sich nicht auf die Beine, bewegt sich nicht. Der Kopf liegt; es schläft oder schlummert tief; die Augen sind geschlossen, das Maul ist ein wenig aufgesperrt. Atmung 14, tief, gleichmäßig. Die Schmerzreflexe sind schwach. Das Bewußtsein ist verdunkelt.

Versuch 23a (Lecithine).

Geht meistenteils im Zimmer umher, die Hinterbeine etwas einknickend. Legt sich oft ein wenig auf ½ bis 1 Minute auf den Bauch nieder. Läßt man das Tier in den Korridor, so läuft es dort fix herum. Die Schmerzreflexe sind etwas schwach. Reagiert auf Geräusch, das Bewußtsein ist verdunkelt. Schlummert von Zeit zu Zeit.

Nach 4 Stunden: Einigermaßen wesentliche Veränderungen bleiben aus.	Legt sich selten etwas nieder, schlummert wenig, läßt sich selten auf die Seite nieder.
Nach 10 Stunden: Macht bisweilen ein paar Schritte und legt sich nieder.	Geht im Zimmer und läuft im Korridor beinahe normal herum.
Nimmt keinen Fraß.	Nimmt keinen Fraß.

Folglich ließ sich bei dem Versuche 23a eine bedeutende Belebung der motorischen Sphäre und eine merkliche auch der Schmerzreflexe beobachten. Das Bewußtsein blieb verdunkelt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Versuchs-Nr.	Tiere	Anzahl der Tiere	Morphium muriaticum pro 1 kg g	Lecithine pro 1 kg g	Lecithine Einführungsweise	Beeinflussung der Morphiumwirkung durch Lecithine
19c	Kaninchen	1	0,2	0,2 × 2*)	intraperitoneal 2 und 1 Tag vor	bedeutende Abschwächung der Morphiumwirkung
28a	"	3	0,2	0,1 × 2*)	intraperitoneal 2 und 1 Tag vor	schwache Abschwächung der Morphiumwirkung
28aa	"	2	0,2	0,2	intraperitoneal 4 Stunden vor	mittelmäßige Abschwächung der Morphiumwirkung
23a	Hund	1	0,02	0,2 × 2*)	intraperitoneal 2 und 1 Tag vor	bedeutende Abschwächung der Morphiumwirkung

*) Gesamtmenge im Verlauf von 2 Tagen.

Aus Tabelle III geht hervor, daß 1. die vorhergehend in die Bauchhöhle eingeführten Lecithine die Wirkung des nachfolgend injizierten Morphiums bedeutend abzuschwächen imstande sind. 2. Diese Einwirkung der Lecithine kann sogar bei ihrer einige Stunden vor der Vergiftung erfolgten Einverleibung in Dosis 0,2 g pro 1 kg stattfinden.

8. Nachfolgende Einführung der Lecithine in die Bauchhöhle.

Die Versuche wurden an vier Kaninchen angestellt. Die Lecithine führten wir in die Bauchhöhle eine Stunde nach der Morphiuminjizierung in Gabe von 0,2 g pro 1 kg ein. Die Lecithinversuche wurden 2 Wochen nach den Kontrollversuchen ausgeführt. Morphium muriaticum wurde ebenfalls pro 1 kg gerechnet.

Versuche 19 und 19d.

Dem Kaninchen wurde Morphium muriaticum zu 0,2 g pro 1 kg injiziert.

Versuch 19 (Kontrolle).	*Versuch 19d (Lecithine).*
Nach 2 Stunden: Atmung 32, oberflächlich. Liegt hart am Boden. Wird das Tier beunruhigt, so bewegt es sich selten, träge. Von selbst bewegt es sich nicht. Die Schmerzreflexe sind schwach. Die Augen sind geschlossen, halb geschlossen, schläft — schlummert.	Atmung 32 bis 36. Sitzt geduckt. Oft bewegt sich das Tier von selbst in Sprüngen auf einige Schritte. Schlummert, die Augen sind halb geschlossen; die Schmerzreflexe sind etwas schwach.

Nach 4 Stunden: Bewegt den Kopf dann und wann von Seite zur Seite.	Bald sitzt das Tier, bald liegt es. Schlummert wenig. Bei leichter Beunruhigung läuft es fünf bis zehn Schritte weg. Ein Drücken des Schwanzes und der Pfötchen wird sichtlich empfunden. Frißt Apfelschalen.
Nach 6 Stunden: Fast ohne Veränderung.	Bewegt sich oft von selbst.
Nach 9 Stunden: Fast ohne Veränderung.	Dasselbe.

Versuche 21 und 21b.

Ein Kaninchen. Die Anordnung ist dieselbe wie die des vorhergehenden Versuchs.

Versuch 21 (Kontrolle).	*Versuch 21b (Lecithine).*
Nach 4 Stunden: Liegt hart am Boden; Atmung 26. Schläft — schlummert, bewegt sich fast gar nicht. Läßt sich platt hinlegen und bleibt so liegend 1 bis 1 ½ Minuten. Die Schmerzreflexe sind schwach. Die Augen sind halb geschlossen.	Das Tier sitzt, bisweilen liegt es. Atmung 30. Schlummert leicht. Die Schmerzreflexe sind etwas schwach. Beunruhigt, bewegt es sich langsam, etwas träge.
Nach 6 Stunden: Bei leichter Beunruhigung bewegt sich das Tier träge, wenig, zwei bis drei Schritte weit.	Bewegt sich oft selbständig. Beunruhigt, geht es leicht, fix fort. Die Augen offen. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach.
Nach 8 Stunden: Fast dasselbe.	Geht oft von selbst im Zimmer herum.
Nach 10 Stunden: Fast dasselbe.	Die Schmerzreflexe sind fast normal.

Versuche 15 und 15a.

Zwei Kaninchen wurde Morphium muriaticum zu 0,35 g gegeben. Die Vergiftung war bei diesen Versuchen schwer. So liegen die Tiere sogar nach 8 Stunden platt ausgestreckt, Atmung von 12 bis 18, oberflächlich; sie bewegen sich selten, wenig, träge.

Die Ergebnisse dieser drei Versuche sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Versuchs-Nr.	Tiere	Anzahl der Tiere	Morphium muriaticum pro 1 kg g	Beeinflussung der Morphiumwirkung durch Lecithine
19 d	Kaninchen	1	0,2	bedeutende Abschwächung der Morphiumwirkung
21 b	"	1	0,2	dasselbe
15 a	"	2	0,35	schwache Wirkung

Folglich sind die den Kaninchen nach der Morphiuminjizierung intraperitoneal eingeführten Lecithine imstande, eine bedeutende Abschwächung

der Intoxikation zu erzeugen, wenn die Morphiumdosis nur nicht verhältnismäßig zu groß ist (s. Versuch 15a).

Diese Versuche werden von uns eingehender bearbeitet zwecks Feststellung der Anwendbarkeit gegebener, intraperitoneal einzuführender Lipoide zur Hilfeleistung bei Morphiumvergiftungen.

4. Versuche mit Einverleibung der Lecithine in die Vena jugularis.

Hanschmidts an Hunden ausgeführte Versuche mit vorhergehender, d. h. vor der Morphiumvergiftung ausgeführter Lecithineinspritzung in die Vena jugularis haben gezeigt, daß die Lecithine abschwächend auf diese Vergiftung wirken. Unsere in dieser Zeitschrift (**150**, 177) gebrachten Versuche bestätigen das. Die von uns ausgeführten, weiter unten beschriebenen Versuche unterscheiden sich von solchen *Hanschmidts* wesentlich dadurch, daß die Lecithine dabei nach der Vergiftung injiziert wurden. Die Kontrollversuche wurden 2 Wochen vor den Lecithinversuchen angestellt. Morphium muriaticum wurde subkutan eingeführt. Die Lecithineinverleibung geschah in der Form von 10proz. Emulsion 1 bis 2 Stunden nach der Morphiuminjizierung unter Äthernarkose, damit die Operation selbst, obwohl sie eine leichte ist, keine Erregung des durch Morphium deprimierten Zentralnervensystems auslöse. In der Regel befanden sich die Tiere vor der Einverleibung der Lecithine unter dem Einfluß des Morphiums in einem Zustande von tiefer Narkose. Spezielle Kontrollversuche mit Einführung unter solchen Bedingungen von physiologischer Kochsalzlösung statt der Lecithinemulsion haben gezeigt, daß die in Rede stehende Operation, mit Beobachtung besagter Maßnahmen ausgeführt, an und für sich keine Belebung bei Morphiumvergiftungen hervorrufen kann.

In den nachstehend geschilderten Versuchen werden die Morphium- und Lecithindosen pro 1 kg Körpergewicht des Tieres gerechnet. Auch zu diesen Versuchen wurden frische Tiere benutzt.

Versuche 15 und 15a.

Dem Kaninchen wurden 0,35 g Morph. muriatici eingeführt [Versuch 15 (Kontrolle)]; nach 2 Wochen bekam es genau so viel Morphium und nach 1 Stunde 0,1 g Lecithin [Versuch 15a (Lecithin)].

Versuch 15.	*Versuch 15a.*
Nach 1 Stunde: Atmung 12; liegt, Bauch und Kopf platt auf dem Boden; läßt sich leicht auf die Seite legen und verbleibt so 5 und mehr Minuten. Schläft, bewegt sich nicht von der Stelle. Die Schmerzreflexe sind schwach. Läßt sich leicht platt hinlegen und ändert die Lage 5 und mehr Minuten nicht.	Injizierung von Lecithinemulsion.

Nach 4 Stunden: Atmung 18; bewegt sich bisweilen etwas träge. Kann auf die Seite und platt ausgebreitet auf 2 bis 3 Minuten hingelegt werden.	Liegt, den Leib knapp am Boden, schläft—schlummert. Bisweilen bewegt sich das Tier ein wenig, träge. Läßt sich nicht auf die Seite, läßt sich nicht platt ausgebreitet hinlegen. Atmung 18.
Nach 8 Stunden: Atmung 24 bis 27. Läßt sich weder auf die Seite, noch platt ausgebreitet hinlegen.	Atmung 24, im übrigen dasselbe.

Versuch 19 und 19b.

Das Kaninchen bekam 0,2 g Morphium muriaticum; die Lecithine wurden nach 2 Stunden eingeführt; Gabe = 0,2 g.

Versuch 19 (Kontrolle).	*Versuch 19b (Lecithine).*
Nach 3 Stunden: Liegt hart am Boden, schläft. Atmung 32. Schwache Schmerzreflexe. Dann und wann bewegt sich das Tier träge, ein wenig.	1 Stunde nach der Lecithineinspritzung[1]) sitzt das Tier, bewegt oft den Kopf, ändert oft den Platz, indem es sich im Zimmer in Sprüngen bewegt. Bei leichter Beunruhigung (Quetschen des Schwanzes u. a.) geht es rasch weg. Die Schmerzreflexe sind etwas unter der Norm. Schlummert zuweilen ein wenig mit halb geschlossenen Augen.
Nach 6 Stunden: Atmung 36.	Sitzt normal mit offenen Augen. Schmerzreflex normal.
Nach 10 Stunden: Bei Beunruhigung rückt es ein wenig, träge ein paar Schritte weiter. Aus eigenem Antrieb bewegt es sich fast gar nicht.	Dasselbe.

Versuche 25 und 25a.

Die Versuchsanordnung ist die nämliche wie bei den vorhergehenden Experimenten.

Versuch 25 (Kontrolle).	*Versuch 25a (Lecithine).*
Nach 4 Stunden: Liegt flach ausgebreitet, schläft — schlummert. Bewegt sich sehr selten und wenig, träge. Atmung 18, gleichmäßig, oberflächlich.	2 Stunden nach der Lecithineinspritzung[2]): Liegt platt ausgestreckt; bewegt sich oft aus freiem Antrieb, etwas träge. Versucht man, es auf die Seite zu legen, so sträubt es sich energisch und geht weg. Atmung 24, einigermaßen oberflächlich. Schlummert ein wenig.

[1]) = 3 Stunden nach der Morphiuminjektion.
[2]) = 4 Stunden nach der Morphiuminjektion.

Nach 6 Stunden: Atmung 24. Beunruhigt, bewegt sich das Tier träge und wenig. Die Augen sind halb geschlossen.	Bald sitzt das Tier, bald liegt es. Bewegt sich oft im Zimmer umher, lebhaft. Schläft nicht, schlummert nicht. Die Augen sind ganz offen. Bewegt oft den Kopf, frißt Apfelschalen. Die Schmerzreflexe sind etwas schwächer als in normalem Zustande.
Nach 8 Stunden: Das Tier bewegt sich aus freiem Antrieb wenig, träge, den Bauch schleppend. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach.	Dasselbe.
Nach 10 Stunden: Fast dasselbe.	Dasselbe.

Versuche 24 und 24a.

Nach 4 Stunden: Atmung 24, oberflächlich, unregelmäßig. Liegt hart am Boden. Schläft — schlummert tief. Die Augen sind geschlossen oder halb geschlossen. Läßt sich hinlegen: auf die Seite auf 2 bis 3 Minuten, platt ausgebreitet auf 1½ bis 2 Minuten. Von selbst bewegt es sich nicht, beunruhigt, bewegt es sich sehr wenig.	Liegt hart am Boden, schlummert mitunter. Die Augen sind halb geschlossen. Aus freiem Antrieb bewegt sich das Tier wenig, leicht beunruhigt, hingegen fix. Die Schmerzreflexe sind etwas schwach, treten aber deutlich hervor.
Nach 6 Stunden: Kann weder auf die Seite gelegt, noch platt ausgebreitet hingelegt werden.	Bald sitzt es, bald liegt es. Dann und wann bewegt es sich von selbst. Schläft nicht, schlummert nicht.
Nach 8 Stunden: Etwas schwache Schmerzreflexe. Bald sitzt das Tier, bald liegt es platt am Boden. Von selbst bewegt es sich wenig, selten, träge; ebenso bei Beunruhigung. Die Augen sind meistenteils geschlossen.	Bewegt sich aus freiem Antriebe fix. Die Augen sind offen. Sitzt.
Nach 10 Stunden: Fast dasselbe.	Dasselbe.

Versuche 20 und 20b.

Dem Hunde wurden 0,02 g Morph. muriat. eingespritzt; die Lecithindosis zu 0,2 g war eine Stunde nach der Vergiftung eingeführt.

Versuch 20 (Kontrolle).	*Versuch 20b (Lecithine).* (= 3 Stunden nach Lecithineinspritzung.)
Nach 4 Stunden: Liegt, Kopf auf dem Boden, seitwärts. Die Augen sind geschlossen, das Maul ist etwas geöffnet. Schläft, Bewegt sich nicht. Atmung 15, tief. Die	Liegt auf dem Bauche, schlummert; Atmung 18, tief. Läuft oft hin und her, ziemlich muntere, Schmerzreflexe etwas schwach; ein Quetschen des Schwanzes mit

Schmerzreflexe sind schwach. Bisweilen hebt es den Kopf. Das Bewußtsein ist verdunkelt.	Fingern zwingt das Tier, aufzustehen und sich umzuwenden. Die Augen sind offen, bisweilen halb geschlossen. In den Korridor gelassen, läuft das Tier mutwillig, ein wenig von Seite zur Seite wankend. Das Bewußtsein ist verdunkelt.
Nach 8 Stunden: Angerufen, zuckt das Tier zusammen.	Bald geht es im Zimmer umher, bald liegt es auf dem Bauche. Läuft fix im Korridor herum, ohne zu taumeln.
Nach 12 Stunden: Schlummert. Auf die Beine gestellt, macht das Tier ein paar Schritte und legt sich nieder.	Hat ein wenig Fleisch gefressen. Bald läuft es im Zimmer umher, bald liegt es auf dem Bauche. Das Bewußtsein ist ziemlich verdunkelt.

Versuche 23 und 23a.

Hund, die Anordnung ist die des vorhergehenden Versuchs.

Versuch 23 (Kontrolle).	*Versuch 23a (Lecithine).*
Nach 6 Stunden: Liegt auf der Seite, schläft, die Augen sind halb geschlossen. Bisweilen macht sich das Tier auf sehr kurze Zeit auf und winselt schwach. Dann und wann bewegt sich das Tier ein wenig, indem es kriecht. Die Schmerzreflexe sind abgeschwächt. Zuweilen liegt es platt ausgestreckt. Das Bewußtsein ist verdunkelt.	Liegt auf dem Bauche, die Augen sind offen, winselt mitunter schwach. Geht oft im Zimmer umher. In den Korridor hinausgelassen, läuft das Tier ziemlich fix, etwas taumelnd umher. Angerufen, sieht es sich um, nähert sich ein wenig dem Rufenden. Die Schmerzreflexe sind etwas schwach. Das Bewußtsein ist verdunkelt.
Nach 8 Stunden: Rückt auf den Beinen selten und sehr wenig, träge weiter. Auf die Beine gestellt, steht das Tier wankend da, legt sich rasch, schwerfällig nieder. Schlummert.	Schlummert nicht. Geht im Zimmer fast normal umher. Läuft im Korridor normal umher. Geht richtig zu dem Rufenden. Ist etwas scheu.
Nach 10 Stunden: Setzt sich selten. Folgt selten dem Rufe. Hat ein paar Stückchen Brot gegessen, nimmt kein Fleisch.	Nähert sich dem Rufenden, setzt sich, schmeichelt sich an. Frißt gern Fleisch. Erschrickt nicht. Schlummert nicht. Bald geht es im Zimmer herum, bald liegt es.

Versuche 26 und 26a.

Dem Hunde wurden sowohl bei dem Kontrollversuche (Nr. 26) als auch bei dem mit Lecithin (Versuch 26a) je 0,04 g Morph. muriat. (zweimal zu 0,02 g) während 2 Stunden injiziert; die Lecithine gab man in Quanten von 0,2 g 1 Stunde nach der ersten Morphiuminjizierung.

Versuch 26.	*Versuch 26a.*
Nach 3 Stunden: Liegt, den Kopf auf der Seite, schläft oder schlummert mehr oder minder tief. Dann und wann hebt das Tier den Kopf. Die Augen sind meist geschlossen. Bewegt sich gar nicht auf den Beinen im Zimmer. Die Schmerzreflexe sind schwach.	Liegt auf der Seite, schlummert. Nähert man sich dem Hunde, so springt er auf, läuft schnell, wankend im Zimmer herum. In den Korridor hinausgelassen, läuft er fix, etwas taumelnd. Zuweilen steht er von selbst auf und geht im Zimmer umher. Das Bewußtsein ist verdunkelt. Die Schmerzreflexe sind ein wenig schwach.
Nach 5 Stunden: Springt beim Türgeräusch auf.	Leichter Schlummer. Im Korridor läuft das Tier rasch herum, taumelt nicht, stößt nicht auf Möbel und andere Gegenstände.
Nach 7 Stunden: Liegt zusammengekauert, schlummert, Kopf herabhängend. Manchmal geht das Tier ein wenig im Zimmer auf und ab.	Hat gekochtes Fleisch gefressen.
Nach 8 Stunden: Fast dasselbe.	Dasselbe.

Versuche 26a und 26b.

Die Anordnung ist die nämliche wie in den vorhergehenden Versuchen.

Versuch 26a.	*Versuch 26b.*
Nach 3 Stunden: Liegt auf der Seite, schläft. Bei Geräuschen wacht das Tier auf und hebt den Kopf. Die Augen sind geschlossen. Die Schmerzreflexe sind schwach. Bewegt sich nicht fort.	Bald läuft das Tier im Zimmer umher, bald läßt es sich auf den Bauch und Seite nieder. Bisweilen schlummert es leicht, die Augen sind meist offen. Nähert sich, wenn man es ruft, schmeichelt sich an. Läuft im Korridor herum, taumelt dabei ein wenig.
Nach 5 Stunden: Springt bisweilen auf und macht ein paar Schritte im Korridor, Maul ein wenig aufgesperrt, Augen halb geschlossen.	Geht oft im Zimmer umher. Schwache Schmerzreflexe. Läuft im Korridor fix herum. Legt sich manchmal auf den Bauch nieder.
Nach 7 Stunden: Das Tier bewegt sich mitunter ziemlich frei im Zimmer; schläft — schlummert häufiger, indem es bisweilen aufwacht und auf die Beine aufspringt.	Schlummert nicht, schläft nicht. Verhält sich ruhig. Springt bei leisem Anrufe auf.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

Versuchs-Nr.	Tiere	Anzahl der Tiere	Morphium muriaticum pro 1 kg g	Lecithine pro 1 kg g	Einfluß der Lecithine auf die Morphiumwirkung
15 a	Kaninchen	1	0,35	0,1	schwacher Einfluß
19 b	„	1	0,2	0,2	bedeutende Abschwächung der Morphiumwirkung
25 a	„	1	0,2	0,2	
24 a	„	1	0,2	0,2	
20 b	Hund	1	0,02	0,2	
23 a	„	1	0,02	0,2	
26 a	„	1	0,02 × 2	0,2	
26 b	„	1	0,02 × 2	0,2	

Aus Tabelle V geht hervor, daß die Lecithine bei besagter Einführungsweise in den Organismus — bei Kaninchen und Hund allerdings — einen bedeutenden abschwächenden Einfluß auf die toxische Wirkung des Morphiums ausüben. Diese Einwirkung des Lecithins zeigt sich hauptsächlich in der motorischen Sphäre vorzüglich vor der Sphäre des Bewußtseins. Eine derartige Anwendung von Lecithinen verdient es, in Fällen von akuter, scherer Morphiumvergiftung an Menschen geprüft zu werden.

Ähnliche Lecithinwirkung bei intraperitonealer Einverleibung hat auch *Nerking* (l. c.) an einem Kaninchen (bei 0,04 g Morph. muriat. pro 1 kg) und an einem Hunde (bei 0,016 g Morph. muriat. pro 1 kg) beobachtet.

Zur therapeutischen Anwendung der Lecithine auf den Menschen per venam wird selbstredend irgend eine peripherische Extremitätenvene genommen.

Der zu betrachtende Einfluß der Lecithine hängt vermutlich vor allem von deren lipoiden Natur ab. Offenbar befördern die Lecithine die Verteilung des Morphiums in dem Organismus, indem sie dieses besonders von bestimmten Teilen des Zentralnervensystems, darunter auch von dem motorischen, ableiten.

Wiederholte Einführung der Lecithine subkutan rufen bei Kaninchen und Hunden keine unerwünschte lokale Wirkungen hervor. Solche Injizierungen sind am meisten bei chronischen Morphiumvergiftungen geeignet.

Ausländische Arbeiten, den Einfluß der Lecithine auf die Morphiumwirkung betreffend, wie auch überhaupt Untersuchungen über Pharmakodynamik der Lecithine vom Zeitraum Juni 1924 bis Mai 1925 sind mir leider nicht bekannt.

Literatur.

1) *J. Nerking*, Münch. med. Wochenschr. 1909. — 2) *E. Hanschmidt*, Inaug.-Diss. Jurjew-Dorpat 1914, aus dem pharmakologischen Institut von Prof. *D. Lawrow*.

Das Adsorptionsvermögen und das elektrische Verhalten verschiedener Kohlenpräparate.

Von

Iwao Ogawa.

(Aus dem biochemischen Institut der Aichi-Medizinischen Universität, Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 25. April 1925.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Vielfache Erfahrungen haben ergeben, daß das Adsorptionsvermögen verschiedener Präparate von Kohle sehr verschieden ist. Eine gute Kohle ist das vielseitigste aller Adsorptionsmittel. Es unterscheidet sich von anderen adsorbierenden Pulvern vor allem dadurch, daß es nicht nur kolloide und gewöhnliche Elektrolyte adsorbiert, sondern auch in besonders hohem Maße nichtelektrolytartige, kapillaraktive Substanzen. Diese letztere Eigenschaft wurde früher infolge einer irrtümlichen Deutung des *Gibbs*schen Theorems für eine allgemeine Eigenschaft aller Phasengrenzflächen gehalten. Wie jedoch *Michaelis* und *Rona*[1]) zeigten, ist diese Fähigkeit eine fast spezifische Eigenschaft der Kohlenoberfläche und findet sich bei anderen Pulvern meist gar nicht, in vereinzelten Fällen nur in Spuren wieder, selbst bei solchen Pulvern, welche für Kolloide und Farbstoffe ein starkes Adsorptionsvermögen haben. Aber obwohl die Kohle auf alle Fälle durch diese Eigenschaft von anderen Substanzen ausgezeichnet ist, sind die Eigenschaften der verschiedenen Kohlenpräparate untereinander verschieden, und nicht nur quantitativ, indem man gut und schlecht adsorbierende Kohle unterscheiden könnte, sondern zum Teil auch qualitativ.

Um einige Beispiele zu nennen, so fanden *Michaelis* und *Rona*[2]), daß Blutkohle basische und saure Farbstoffe annähernd gleich gut adsorbiert, ebenso KCl und NaOH, und ihre elektrische Ladung gegen die Lösung ist

[1]) Diese Zeitschr. **102**, 268, 1920;
[2]) Ebendaselbst **97**, 57, 1919; **97**, 85, 1919.

nach *Gyemant*[1]) und *Umetsu*[2]) in saurer Lösung positiv, in alkalischer negativ. Dagegen fand *Umetsu*[3]), daß Zuckerkohle fast nur basische Farbstoffe adsorbiert und selbst in Gegenwart von HCl niemals positiv umgeladen wird. Ferner adsorbiert Blutkohle aus Neutralsalzlösungen immer äquivalente Mengen von Anionen und Kationen, während nach *Miller*[4]) eine durch starkes Erhitzen aktivierte Zuckerkohle aus Neutralsalzlösungen stets einen Überschuß der Säure unter hydrolytischer Spaltung adsorbiert. *O. Warburg*[5]) fand, daß Aceton von Benzoesäurekohle, Cystin von Blutkoh'e besser adsorbiert wird, während gegenüber Bernsteinsäure und Amylalkohol das Verhalten beider Kohlen gleich ist. Methylenblau wird von Blutkohle sehr stark, von Benzoesäurekohle sehr schwach adsorbiert; Blutkohle in Wasser nimmt keinen Sauerstoff auf, wohl aber Benzoesäurekohle. *Pincussen*[6]) fand, daß die Adsorption von Methylenblau bei Tierkohle und Caseinkohle durch Vermehrung der H-Ionenkonzentration erheblich gesteigert wird, bei Rohrzucker- und Traubenzuckerkohle sich vielleicht sogar etwas vermindert, jedenfalls nicht erhöht.

Unter diesen Umständen muß man sich die Frage vorlegen, ob die Verunreinigungen der Kohle diese Unterschiede hervorgerufen haben. Bei den Verunreinigungen müssen wir zwei Dinge wesentlich unterscheiden. Erstens kann es sich um anorganische oder jedenfalls schwer verbrennliche Beimengungen handeln, wie Silikate, Kalksalze oder um die von *O. Warburg*[7]) beschriebene Stickstoffeisenverbindung, welche die Fähigkeit der Kohle zur Oxydationskatalyse auffällig verändert. Oder es kann sich um Produkte der unvollständigen Verkohlung der organischen Substanz handeln, aus welcher die Kohle hergestellt ist, um Zwischenstadien zwischen den bei der Verkohlung zunächst auftretenden braunschwarzen Substanzen, welche zwar viel C enthalten, aber doch nicht allein aus C bestehen und zum Teil noch in Ligroin und dergleichen löslich sind. Von diesen Substanzen bis zum reinen Kohlenstoff mag es Übergänge geben, welche neben viel C auch noch H und vielleicht auch O enthalten und in organischen Lösungsmitteln unlöslich sind.

Die Beteiligung der ersten Art von Verunreinigung, der Aschenbestandteile, zu erkennen, haben wir zwei Mittel. Die erste Methode, welche von *Michaelis* und *Rona*[8]) angewendet wurde, besteht in folgendem. Alle Aschenbestandteile können organische Farbstoffe nur vermittelst einer Austauschadsorption binden. Bei basischen Farbstoffen wird das Kation des Farbstoffs gegen ein Kation des Aschebestandteils ausgetauscht, bei sauren das Anion gegen ein Anion. Dagegen kann die Kohle selbst die beiden Ionen eines Farbstoffs immer nur in äquivalenten Mengen binden, weil sie kein Ion zum Austausch findet. Bei der Blutkohle tritt hierbei sogar niemals hydrolytische Spaltung ein, und es wird immer das Kation und Anion des Farbsalzes in äquivalenten Mengen adsorbiert. Infolgedessen kann man aus dem Betrage des Austauschs z. B. von Methylenblau- und

---

[1]) Kolloid-Zeitschr. **28**, 103, 1921.
[2]) Diese Zeitschr. **135**, 442, 1923.
[3]) Diese Zeitschr. **135**, 442, 1923.
[4]) Journ. of the Amer. chem. soc. **45**, 1106, 1923.
[5]) Diese Zeitschr. **119**, 134, 1921.
[6]) Ebendaselbst **137**, 117, 1923.
[7]) Ebendaselbst **145**, 461, 1924.
[8]) Ebendaselbst **97**, 57, 1919.

Ca-Ionen die Beteiligung der Verunreinigungen an der Adsorption erkennen. Es zeigte sich, daß bei einem guten Präparat von Blutkohle die Verunreinigungen einen zwar erkennbaren, aber sehr geringen Anteil an der Gesamtadsorption haben, und es gelang auf diese Weise, die Natur der Adsorption der eigentlichen Kohlenoberfläche zu erkennen.

Die andere Methode besteht darin, daß man von vornherein mit einer aschenfreien Kohle arbeitet. Diese Methode steht uns erst zur Verfügung, seitdem man gelernt hat, aschenfreie und doch adsorptionskräftige Kohlen herzustellen. Lange Zeit neigte man zu der Ansicht, daß die Verunreinigungen geradezu notwendig seien, um adsorptionskräftige Kohle zu erzeugen. *Rosenthaler* und *Türck*[1]) stellten fest, daß gut adsorbierende Kohlensorten nicht gerade die aschenärmsten sind. In den letzten Jahren äußerten mehrere Autoren[2]) die Ansicht, daß Aschenbestandteile oder O- oder N-haltige Verbindungen, komplizierte Zusammensetzungen die Aktivität der Kohle bedingen. *Knecht*[3]) und *Patterson*[4]) beschrieben einen N-haltigen Extrakt der Knochenkohle, dem sie die entfärbende Kraft zuschrieben, was von *Gall*[5]) bestätigt, von *Philip*[6]) aber geleugnet wurde. Alle diese Vorstellungen über die Wirksamkeit von Verunreinigungen müssen aber geändert werden, nachdem sich gezeigt hat, daß ganz aschefreie Kohlen durch Erhitzen adsorptionstüchtig gemacht werden können. *Winter* und *Baker*[7]) zeigten, daß durch starkes Erhitzen reinste Zuckerkohle ihr Adsorptionsvermögen für SO_2 auf das Dreifache erhöht, während ihr spezifisches Gewicht sich bei der Erhitzung 40 Stunden lang auf 900° von 1,76 auf 1,84 erhöht. Das gleiche fand *Firth*[8]) für Kokosnußkohle bei Versuchen mit Adsorption von NH_3, *Philip*[9]) für Holzkohle bei der Adsorption von SO_2 und Methylenblau. Je besser bei der Erhitzung die Luft zutreten kann, um so größer ist gleichzeitig die Änderung des spezifischen Gewichts und des Adsorptionsvermögens. Beim Erhitzen im Stickstoffstrom ändern sich beide Eigenschaften nicht. Genaue Untersuchungen über die Hitzeaktivierung reinster Zuckerkohle hat *Miller*[10]) gemacht. Durch geeignete Erhitzung erhielt er Präparate, die vielleicht alle anderen bisher bekannten an Adsorptionsvermögen übertreffen. Diese Kohle hatte im Gegensatz zur Blutkohle die Eigenschaft, HCl, nicht aber NaOH zu adsorbieren und aus Neutralsalzen etwas freie Säure zu adsorbieren und Lauge zurückzulassen.

Über die Wirkungsweise der Erhitzung bildete sich *Philip*[11]) die Vorstellung, daß durch langsame Oxydation die Poren und kapillaren Gänge in den Kohlekörnern erweitert werden und den zu adsorbierenden Gas-

---

[1]) Arch. f. Pharm. **244**, 517, 1906.

[2]) *Warburg*, diese Zeitschr. **119**, 134, 1921; *Liesegang*, Chem.-Ztg. **44**, 89, 1920; *Kolthoff*, Pharm. Weekbl. **57**, 630, 1920; zitiert nach Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **9**, 165, 1922.

[3]) Journ. Soc. Chem. Ind. 28, 700, 1909.

[4]) Ebendaselbst **22**, 608, 1903.

[5]) Journ. of industr. a. engin. Chem. **14**, 18, 1922; zitiert nach Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **12**, 170, 1922.

[6]) Journ. of Chem. Soc. (London) **117**, 362, 1920.

[7]) Ebendaselbst **117**, 319, 1920.

[8]) Ebendaselbst **119**, 926, 1921.

[9]) Ebendaselbst **117**, 362, 1920.

[10]) Journ. of the Amer. Chem. Soc. **44**, 1866, 1922.

[11]) Journ. of Chem. Soc. (London) **117**, 362, 1920.

molekülen der Zutritt zu der inneren Oberfläche erleichtert würde. *Scheldon*[1]) nimmt an, daß zwischen 600 und 900° die Kohlenwasserstoffe fortgekocht werden, so daß die Oberfläche der Kohle bloßgelegt wird. Er meint, daß bei noch höheren Temperaturen ein Zerfall der Kohlenwasserstoffe stattfindet, so daß auf einem aktiven Untergrund sich inaktiver C abscheidet und die Aktivierung wieder zurückgeht. In meinen Versuchen konnte ich bei den für uns erreichbaren Temperaturen einen Rückgang der Aktivierung nicht beobachten. Nach *Scheldon*[2]) kann auch bei gewöhnlicher Temperatur durch langsame Oxydation der Kohlenwasserstoffe allmählich eine Aktivierung eintreten.

Es könnte somit den Anschein haben, als ob die aschefreie, aktivierte Kohle allein das Adsorptionsvermögen des reinen Kohlenstoffs zeigt, während die Unterschiede der anderen Kohlenpräparate allein der Menge und Beschaffenheit der Produkte unvollständiger Verkohlung zugeschrieben werden könnten. Jedoch ist diese Deutung noch nicht gewiß. Wir werden nämlich zeigen, daß selbst sehr stark erhitzte, reine Kohlenpräparate je nach ihrer Herkunft verschiedene Eigenschaften haben. Mehrere derartige Präparate verschiedener Herkunft verhielten sich allerdings gleich. Jedoch gibt es davon bemerkenswerte Ausnahmen, vor allem verhielt sich eine von mir aus Naphthalin hergestellte Kohle anders.

Die benutzten Kohlenpräparate.

Folgende verschiedene Arten von Kohle wurden für die Versuche benutzt.

1. *Blutkohle* von *Merck*, und zwar sowohl das käufliche Präparat ohne weitere Behandlung, wie auch nach starker Aktivierung durch Erhitzung. Die Ausführung dieser Erhitzung wird bei anderen Kohlenpräparaten genauer beschrieben werden.

2. *Zuckerkohle.* 450 g reinster Saccharose (*Merck*) wurden in offener Porzellanschale erhitzt, bis die Entwicklung von Dämpfen aufhörte. Dann wurde die Masse in einem bedeckten Porzellantiegel bei mäßiger Temperatur 6 Stunden lang weiter erhitzt, nach dem Erkalten mit heißer Salzsäure ausgekocht, filtriert und mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen. Ausbeute etwa 90 g. Dieses Präparat werden wir als normale Zuckerkohle bezeichnen. Hieraus wurde die aktivierte Kohle folgendermaßen hergestellt. Die Kohle wurde in einem bedeckten Platintiegel, welcher in einen bedeckten Schamottiegel eingeschlossen wurde, bei sehr geringem Luftzutritt 8 Stunden lang auf starke Rotglut erhitzt. Die Ausbeute von 20 g normaler Kohle beträgt etwa 10 g aktivierter Kohle.

[1]) Proc. nat. acad. sc. Washington **6**, 178, 1920; zitiert nach Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **5**, 166, 1921.

[2]) l. c.

3. *Gelatinekohle.* 450 g käuflicher Gelatine wurden zur Reinigung in 5 Liter Wasser gewaschen, dem 50 ccm eines Acetatgemisches zugesetzt waren, bei einer Temperatur von etwa 6° C. Das Acetatgemisch hatte die Zusammensetzung: 2 Volumen n Essigsäure und 1 Volumen n Ammoniak, also eine Mischung von gleichen Mengen Ammoniumacetat und Essigsäure von einem $p_H = 4{,}6$, entsprechend dem isoelektrischen Punkt der Gelatine. Dieser Puffer enthält keine Stoffe, welche bei der Verkohlung Aschebestandteile hinterlassen können. Diese Flüssigkeit wurde täglich erneuert, und nach 2 Wochen erwies sich eine Probe der stark verquollenen aber nicht peptisierten Gelatine als aschefrei. Diese Gelatine wurde in einer Porzellanschale erhitzt und der dickflüssige Gelatinerückstand in verschiedener Weise weiter behandelt. Eine Portion wurde bei bedecktem Tiegel bei mäßiger Temperatur verkohlt: *normale* Gelatinekohle. Ein Teil dieser Portion wurde in derselben Weise wie bei der Zuckerkohle bei starker Rotglut *aktiviert.* Andere Portionen wurden versuchsweise in anderer Weise bearbeitet. Da diese Versuche kein besonders auffälliges Resultat zeigten, so sei das Ergebnis ohne besondere Protokolle gleich hier zusammengestellt, damit wir später darauf nicht zurückzukommen brauchen. Ein Teil der Gelatine wurde unter möglichst schneller Erhitzung rasch direkt auf Rotglut gebracht. Diese Kohle war etwas adsorptionskräftiger wie die normale Kohle, aber weniger kräftig als die nachträglich aktivierte Kohle. Ein anderer Teil des Gelatinebreies wurde unter Zusatz von Kieselgur einmal bei mäßiger Temperatur, ein anderes Mal bei möglichst hoher Temperatur verkohlt. Der Aschegehalt dreier solcher Präparate betrug 15,9, 17,7, 27,3 Proz. Ein wesentlicher Unterschied im Adsorptionsvermögen gegen die aschefreien Präparate von sonst gleicher Herstellung hat sich nicht ergeben.

4. *Naphthalinkohle.* Einige Gramm Naphthalin werden in einen Porzellantiegel eingetragen, bis zur Entzündung erhitzt und der Ruß an einer übergestülpten großen Glasglocke aufgefangen. Dann wird eine neue Portion Naphthalin eingetragen und ebenso behandelt. Auf diese Weise erhält man aus 450 g Naphthalin 25 g Ruß. Dieser gibt an Ligroin braune Farbstoffe ab. Aus diesem Präparat wurde eine aktive Kohle hergestellt, indem 20 g in der oben beschriebenen Weise bei mangelnder Luftzufuhr 3 Stunden auf Rotglut erhitzt wurde. Ausbeute 10 g. Diese Kohle gibt an Ligroin keine färbende Substanz mehr ab.

5. In derselben Weise wurde aus Paraffin eine Kohle hergestellt, ferner wurde 6. eine Kohle durch Verkohlen von Rindsleber mit einem Aschengehalt von 8,3 Proz. und 7. aus Agar mit einem Aschengehalt von 12,8 Proz. hergestellt.

Versuche über die Adsorption von Wasserdampf und einigen Substanzen in wässeriger Lösung.

Die Tabelle I zeigt die Adsorption von vier verschiedenen Kohlearten in normalem und aktiviertem Zustande gegenüber Wasserdampf. Proben der Kohle wurden bei etwa 120° im Wägeglas bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einem verschlossenen Exsikkatorgefäß über reinem Wasser im Zimmer bis zur Gewichtskonstanz stehengelassen. Dies erfordert etwa 3 Tage. Bei allen Kohlenarten zeigt sich eine Erhöhung des Adsorptionsvermögens, und zwar bei drei Proben etwa auf das 4fache, bei Paraffinkohle sogar auf das 7,5fache.

Tabelle I.
Die Adsorption von Wasserdampf.

Kohlenart		Adsorbierter Wasserdampf (g) pro 100 g trockener Kohle	Vergleichung des Adsorptionsvermögens normal : aktiv.
Zuckerkohle	normal	10,683	1 : 3,91
	aktiviert	41,792	
Gelatinekohle	normal	8,395	1 : 3,61
	aktiviert	30,204	
Paraffinkohle	normal	4,143	1 : 7,48
	aktiviert	30,998	
Naphthalinkohle . .	normal	10,546	1 : 4,61
	aktiviert	48,599	

Tabelle II zeigt die Adsorption von Phenol. Es wurde 1 g Kohle, von der sehr voluminösen Naphthalin- und Paraffinkohle nur 0,5 g, mit 100 ccm 0,896proz. Phenollösung geschüttelt und nach einem halben Tage im Filtrat das Phenol nach der Methode von *Koppeschaar* mit Bromidbromatlösung bestimmt. In allen Fällen ist die Adsorption mit der aktivierten Kohle stärker. Die Unterschiede sind sehr verschieden und schwanken von 1,56 bei Blutkohle, welche schon an sich etwas als aktiviert betrachtet werden darf, bis zu 10,7 bei Gelatinekohle. Ähnliche Versuche wurden mit Jod angestellt, siehe Tabelle III. 0,5 g Kohle wurden mit 100 ccm n/10 Jodjodkalilösung geschüttelt, nach einigen Stunden abfiltriert und das Filtrat analysiert. Die Wirkung der Aktivierung ist etwa ebenso wie gegenüber Phenol, wieder zeigt sich der Unterschied bei den beiden Proben der Gelatinekohle am stärksten.

Für diese Versuche ist der Aschegehalt der Kohle wenig von Belang, und außerdem zeigt sich, daß die Aktivierung das Adsorptionsvermögen für die verschiedenen Stoffe zwar nicht in genau gleichem Maße, aber doch in gleichem Sinne, bisweilen sogar in gleichem zahlenmäßigen Verhältnis erhöht. Die Versuche genügen, um zu beweisen, daß das

Tabelle II.

Die Adsorption des Phenols.

Kohlenart		Adsorbiertes Phenol (g) an 100 g Kohle	Vergleichung des Adsorptionsvermögens normal : aktiv.
Blutkohle (*Merck*)	normal	24,64	1 : 1,56
	aktiviert	38,40	
Holzkohle (*Merck*)	normal	4,83	1 : 2,51
	aktiviert	12,10	
Gelatinekohle	normal	2,35	1 : 10,72
	aktiviert	25,18	
Zuckerkohle	normal	8,42	1 : 3,61
	aktiviert	30,39	
Paraffinkohle	normal	3,60	1 : 6,03
	aktiviert	21,70	
Naphthalinkohle	normal	2,78	1 : 8,20
	aktiviert	22,80	
Leberkohle	normal	6,10	
Agarkohle	normal	4,48	

Tabelle III.

Die Adsorption von Jod.

Kohlenart		Adsorbiertes Jod (g) pro 100 g Kohle	Vergleichung des Adsorptionsvermögens normal : aktiv.
Blutkohle (*Merck*)	normal	86,8	1 : 1,48
	aktiviert	128,7	
Holzkohle (*Merck*)	normal	37,2	1 : 1,49
	aktiviert	54,2	
Gelatinekohle	normal	6,5	1 : 12,63
	aktiviert	82,1	
Zuckerkohle	normal	46,7	1 : 2,71
	aktiviert	126,4	
Paraffinkohle	normal	25,6	1 : 4,59
	aktiviert	117,5	
Naphthalinkohle	normal	33,6	1 : 3,19
	aktiviert	107,5	
Leberkohle	normal	13,3	
Agarkohle	normal	26,6	

allgemeine Adsorptionsvermögen der Kohle durch die Erhitzung erhöht worden ist. Wir kommen jetzt zur Besprechung derjenigen Fälle, bei denen sich das Adsorptionsvermögen von Kohlenpräparaten verschiedener Herkunft wesentlich voneinander unterscheidet.

Adsorption von HCl und NaOH.

Blutkohle adsorbiert HCl und NaOH unter gleichen Bedingungen annähernd gleich stark. Dies wurde von *Michaelis* und *Rona*[1]) schon beschrieben und kann hiermit bestätigt werden (Tabelle IV). Dieselbe Kohle, durch starkes Erhitzen aktiviert, verändert ihre Eigenschaft derart, daß sie HCl viel stärker, aber NaOH überhaupt nicht mehr sicher nachweisbar adsorbiert. Man möchte geneigt sein, diese Veränderung einer Mitwirkung der Aschebestandteile zuzuschreiben. Aber auch bei aschefreien Kohlenpräparaten finden wir ähnliches. Im normalen Zustande adsorbieren sie durchschnittlich HCl und NaOH weniger als Blutkohle. Zuckerkohle und Naphthalinruß adsorbiert NaOH etwas besser als HCl, bei Gelatinekohle ist es umgekehrt. Im aktivierten Zustande wird das Adsorptionsvermögen bedeutend erhöht, und zwar adsorbiert dann Zuckerkohle HCl sehr stark, NaOH praktisch gar nicht. Gelatinekohle adsorbiert HCl noch stärker, aber auch merkliche Mengen NaOH. Naphthalinkohle adsorbiert beide nur wenig, aber unzweifelhaft NaOH stärker als HCl.

Tabelle IV.
Adsorption von HCl und NaOH.

Kohlenart		100 ccm 0,01 n HCl + 1 g Kohle (Naphthalinkohle 0,5 g)			100 ccm 0,01023 n NaOH + 1 g Kohle (Naphthalinkohle 0,5 g)		
		Normalität in Filtrat	Adsorbiert (Normalit.)	Adsorbiert Proz.	Normalität in Filtrat	Adsorbiert (Normalit.)	Adsorbiert Proz.
Blutkohle . .	norm.	0,008 388	0,001 612	16,1	0,008 880	0,001 350	13,2
	aktiv.	0,006 405	0,003 595	35,9	0,009 880	0,000 350	3,4
Zuckerkohle .	norm.	0,009 205	0,000 795	7,9	0,009 000	0,001 230	12,0
	aktiv.	0,007 202	0,002 798	27,9	0,009 900	0,000 330	3,2
Gelatinekohle	norm.	0,008 593	0,001 407	14,1	0,009 520	0,000 710	6,9
	aktiv.	0,005 750	0,004 250	42,5	0,008 350	0,001 880	18,4
Naphthalinkohle .	norm.	0,009 710	0,000 290	2,9	0,009 473	0,000 757	7,4
	aktiv.	0,009 440	0,000 660	6,6	0,008 676	0,001 554	15,2

Auch *Miller*[2]) fand, daß aschefreie aktiverte Zuckerkohle anorganische Säuren adsorbiert, wenn auch nicht so stark wie organische, anorganische Basen aber gar nicht oder fast nicht adsorbiert. Ein anderer Ausdruck für diesen Umstand findet sich in der Beobachtung von *Miller*, daß aktive Zuckerkohle aus Neutralsalzlösungen unter hydrolytischer Spaltung mehr Säure als Base adsorbiert, während Blutkohle in Neutralsalzlösungen nach *Michaelis* und *Rona* keine Hydrolyse erzeugt.

Adsorption von organischen Farbstoffen.

Bei der Adsorption der Farbstoffe müssen wir zwei Fragen unterscheiden, erstens den Unterschied beim Verhalten gegen saure und

[1]) Diese Zeitschr. **97**, 85, 1919.
[2]) Journ. of the Amer. Chem. Soc. **44**, 1107, 1922.

basische Farbstoffe, und zweitens die Frage, ob bei der Adsorption des Farbsalzes eine Hydrolyse eintritt. Diese zweite Frage wurde von den verschiedenen Autoren in verschiedenem Sinne beantwortet, und nach dem Vorangegangenen ist es klar, daß die Ursache hierfür in der Verschiedenheit der angewendeten Kohlenpräparate liegt, wenn auch einige Versuchsfehler in den älteren Arbeiten unterlaufen sein mögen.

Freundlich und *Losev*[1]) beschrieben, daß bei der Adsorption von Kristallviolett durch Blutkohle die Farbbase adsorbiert würde und sich in Form eines besonderen Polymerisationsproduktes an der Kohle niederschlage, während die Säure des Farbsalzes in Lösung bleibt. Bei einigen sauren Farbstoffen fanden sie dagegen keine Hydrolyse. *Michaelis* und *Rona*[2]) fanden für dieselbe Kohle, daß nur ein kleiner Teil des sauren Bestandteils eines basischen Farbstoffes nach der Adsorption in der Lösung gefunden werden kann, und zwar nicht als freie Säure, sondern als Salz, im wesentlichen als Ca-Salz. Sie nehmen deshalb an, daß bei der Adsorption durch die eigentliche Kohle das Farbsalz als ganzes adsorbiert wird und die geringen Mengen $CaCl_2$ in der Lösung durch Austauschadsorption mit den Aschebestandteilen entstehen. *Freundlich* und *Neumann*[3]) untersuchten die Adsorption von Neufuchsin an Benzolruß, welcher im Glasrohr und im CO_2-Strom viele Stunden lang auf helle Rotglut erhitzt worden war. Sie fanden auch hier hydrolytische Spaltung des Farbstoffs bei der Adsorption. *Bartell* und *Miller*[4]) fanden bei der Adsorption von Methylenblau durch aktivierte aschenfreie Zuckerkohle eine hydrolytische Spaltung, und ebenso bei sauren Farbstoffen. Bei Ammoniumpikrat und bei Eosin-Na oder -NH_4 fanden sich die größten freien Alkalimengen im Filtrat bei geringen Farbstoffzusätzen, bei gesteigertem Farbstoffzusatz nahm die Alkalimenge wieder ab. Bei den basischen Farbstoffen, Methylenblau oder Kristallviolett, dagegen war die im Filtrat zurückbleibende HCl-Menge bei kleinen Farbstoffzusätzen noch nicht bemerkbar und wurde erst bei größeren Zusätzen deutlich. Hierhin gehört auch der Befund von *Pincussen*[5]), daß die Adsorptionsfähigkeit von *Merck*scher Blutkohle und von Caseinkohle für Methylenblau durch erhöhte H-Konzentration der Lösung zum Teil sehr erheblich gesteigert, bei Zuckerkohle zum Teil sogar vermindert wird.

In diesem Zusammenhange ist es noch interessant, zu erwähnen, daß *Fritz* und *Rain*[6]) feststellten, daß die Adsorption von Farbstoffen an Kohle, wenigstens am Diamantkristall, nur in monomolekularer Schicht erfolgt. Sie meinen daher, daß das außergewöhnliche Adsorptionsvermögen der Kohle überhaupt nur seiner großen spezifischen Oberfläche zuzuschreiben ist.

In meinen Versuchen beschäftigte ich mich mit der zweiten Frage, wie überhaupt das Adsorptionsvermögen für verschiedene Kohlepräparate durch die Natur der Kohle bestimmt wird.

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **59**, 284, 1907.
[2]) Diese Zeitschr. **97**, 57, 1919.
[3]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **67**, 538, 1909.
[4]) Journ. of the Amer. Chem. Soc. **45**, 1106, 1923.
[5]) Diese Zeitschr. **187**, 117, 1923.
[6]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 1221, 1924.

Die in den folgenden Tabellen (Tabelle Va, b, c) und Diagrammen notierten Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß für einige verschiedene Kohlenarten die Menge der Kohle und die Konzentration des Farbstoffs variiert wurde. Die in den Protokollen notierte Zahl bedeutet die prozentische Adsorption des Farbstoffs, welche durch kolorimetrische Vergleichung der Ausgangslösung und des Filtrats nach der Adsorption ermittelt wurde. Diagramm 1 bis 3 betrifft die Adsorption von Methylenblau und Eosin. Die Abszisse bedeutet die Kohlenmenge in Grammen, die Ordinate die prozentische Adsorption. In Abb. 1 erkennt man, daß für Blutkohle und für Holzkohle das

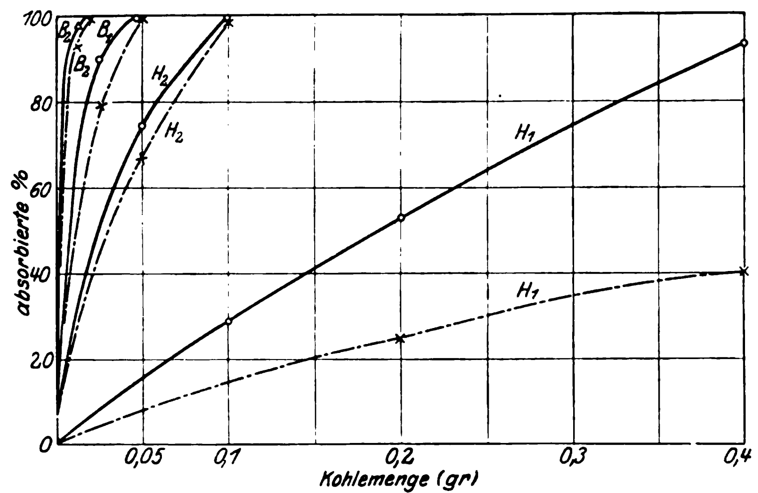


Abb. 1. Adsorption von Methylenblau und Eosin durch Blutkohle (*Merck*) und Holzkohle (*Merck*).
———o——— Methylenblau. —·—·—×—·—·— Eosin.
B_1 = normale Blutkohle, B_2 = aktivierte Blutkohle,
H_1 = normale Holzkohle, H_2 = aktivierte Holzkohle.

Adsorptionsvermögen für beide Farbstoffe durch die Hitzeaktivierung stark erhöht wird. Auf alle Fälle ist das Adsorptionsvermögen für Methylenblau etwas stärker als für Eosin, und die Unterschiede bleiben auch nach der Aktivierung bestehen. In Abb. 2 ist dasselbe für Gelatine- und Zuckerkohle dargestellt. Der Unterschied zwischen Eosin und Methylenblau ist hier noch mehr ausgesprochen. Im normalen Zustande adsorbieren diese beiden Kohlenarten Methylenblau ziemlich wenig, aber gut meßbar, Eosin dagegen adsorbieren sie überhaupt nicht. Durch die Aktivierung wird das Adsorptionsvermögen außerordentlich gesteigert, und zwar so, daß das Adsorptionsvermögen für Eosin immer etwas zurückbleibt hinter dem für Methylenblau. Jedenfalls ist es

eine sehr imposante Erscheinung, daß das Adsorptionsvermögen für Eosin, welches im normalen Zustande = 0 ist, im aktivierten Zustande, ganz besonders für Zuckerkohle sehr kräftig wird. *Umetsu*[1]) hatte beschrieben, daß Zuckerkohle basische Farbstoffe etwas, saure Farbstoffe gar nicht adsorbiert. Wie man sieht, trifft diese Angabe zwar für die normale, aber nicht für die aktivierte Zuckerkohle zu. In Abb. 3 ist das Verhalten von Naphthalin- und Paraffinkohle dargestellt. Auch hier bleibt das Adsorptionsvermögen für Eosin immer ein wenig zurück hinter dem für Methylenblau, aber schon die normale Kohle adsorbiert selbst Eosin ganz gut, besonders die Paraffinkohle. Wiederum bemerkt man die starke Erhöhung der Adsorption nach der Aktivierung.

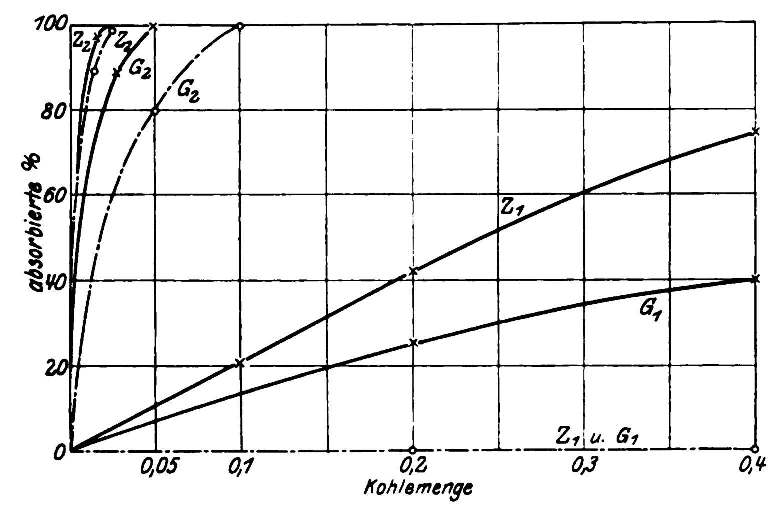


Abb. 2. Adsorption von Methylenblau und Eosin durch Gelatinekohle und Zuckerkohle.
——×——×—— Methylenblau. ——o——o—— Eosin.
G_1 = normale Gelatinekohle, G_2 = aktivierte Gelatinekohle,
Z_1 = normale Zuckerkohle, Z_2 = aktivierte Zuckerkohle.

Abb. 4 stellt die Adsorption von Pikrinsäure an verschiedenen Kohlen dar. Kohle aus Paraffin, Naphthalin, Gelatine, Zucker, Holz adsorbieren im normalen Zustande Pikrinsäure überhaupt nicht. Nur die käufliche Blutkohle, welche schon als ein halb aktiviertes Präparat zu betrachten ist, adsorbiert Pikrinsäure ziemlich gut. Auch eine Kohle aus Leber und aus Agar zeigt schon in normalem Zustande ein mäßiges Adsorptionsvermögen für Pikrinsäure. Durch die Aktivierung wird überall das Adsorptionsvermögen gesteigert, verhältnismäßig wenig für Holzkohle, aber in sehr ausgesprochener Weise für Blut-,

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 443, 1923.

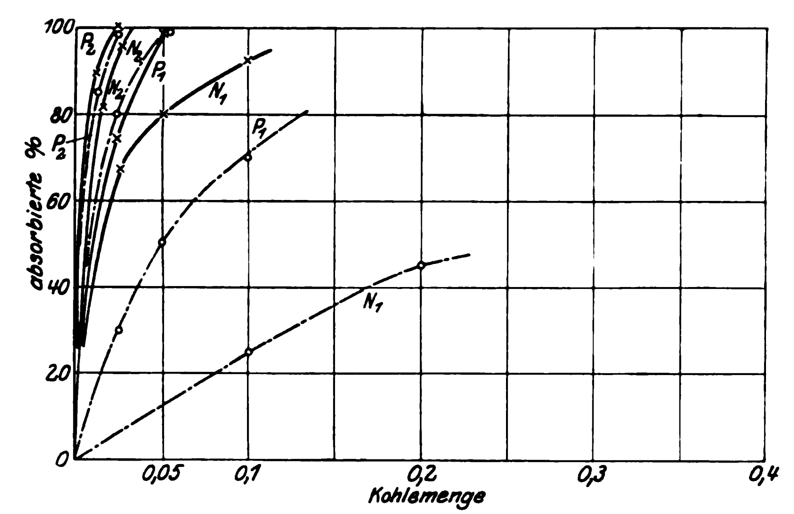


Abb. 3. Adsorption von Methylenblau und Eosin durch Naphthalin- und Paraffinkohle.
——×—— Methylenblau. —·—·—o—·—·— Eosin.
N_1 = normale Naphthalinkohle, N_2 = aktivierte Naphthalinkohle,
P_1 = normale Paraffinkohle, P_2 = aktivierte Paraffinkohle.

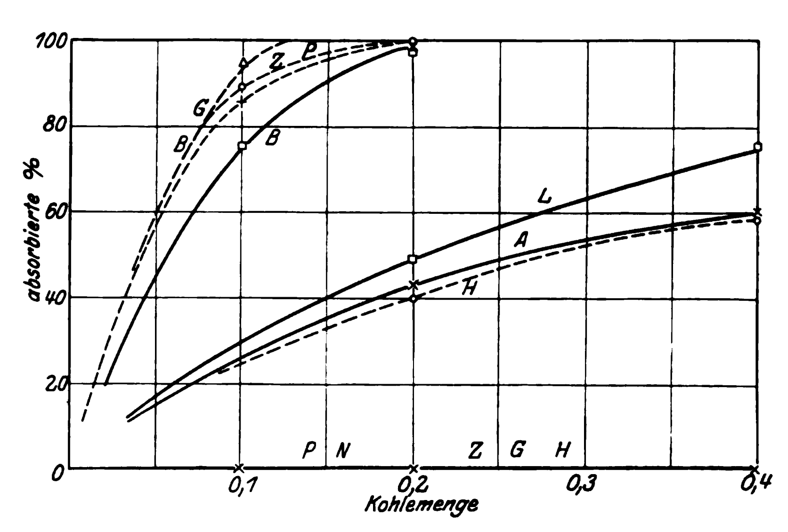


Abb. 4. Adsorption von Pikrinsäure.
———— normale Kohle. – – – – – aktivierte Kohle.

B = Blutkohle, H = Holzkohle, Z = Zuckerkohle, G = Gelatinekohle, N = Naphthalinkohle, P = Paraffinkohle, L = Leberkohle, A = Agarkohle.	Die Abszissenachse bedeutet gleichzeitig die zu *normaler* Kohle P, N, Z, G, H gehörige Adsorptionskurve: hier ist die Adsorption unabhängig von der Kohlenmenge stets = 0. Diese Abbildung zeigt besonders anschaulich den Einfluß der Hitzeaktivierung.

Tabelle Va.

Kohlenart		20 ccm 0,1 prom. Eosin					
		0,0125 g Kohle adsorbiert Proz.	0,025 g Kohle adsorbiert Proz.	0,05 g Kohle adsorbiert Proz.	0,1 g Kohle adsorbiert Proz.	0,2 g Kohle adsorbiert Proz.	0,4 g Kohle adsorbiert Proz.
Blutkohle (*Merck*) . .	normal		80	100			
	aktiv.	96	100				
Holzkohle (*Merck*) . .	normal					25	40
	aktiv.			63	100		
Zuckerkohle .	normal			adsorbiert nicht			
	aktiv.		92	100			
Gelatinekohle	normal			adsorbiert nicht			
	aktiv.			80	100		
Naphthalinkohle .	normal				25	45	
	aktiv.		80	100			
Paraffinkohle	normal		25	50	70		
	aktiv.	85	100				

Tabelle Vb.

Kohlenart		20 ccm 0,1 prom. Methylenblau mit					
		0,0125 g Kohle absorbiert Proz.	0,025 g Kohle adsorbiert Proz.	0,05 g Kohle adsorbiert Proz.	0,1 g Kohle adsorbiert Proz.	0,2 g Kohle adsorbiert Proz.	0,4 g Kohle adsorbiert Proz.
Blutkohle (*Merck*) . .	normal		90	100			
	aktiv.	99	100				
Holzkohle (*Merck*) . .	normal				25	53	85
	aktiv.			75	100		
Zuckerkohle .	normal				20	43	75
	aktiv.	99	100				
Gelatinekohle	normal					25	50
	aktiv.		90	100			
Naphthalinruß	normal		68	80	92		
	aktiv.	82	100				
Paraffinruß .	normal		75	100			
	aktiv.	93	100				

Gelatine-, Zucker-, Paraffin- und Naphthalinkohle. Abb. 5 stellt das Verhalten von Kongorot dar. Dies ist ein saurer Farbstoff, welcher viel mehr die Neigung hat, kolloidale Eigenschaften zu zeigen, als Eosin und Methylenblau, insbesondere durch Salze viel leichter ausgeflockt wird und sein Diffusionsvermögen verliert. Aber selbst dieser Farbstoff wird wenigstens durch normale Zucker- und Gelatinekohle praktisch nicht adsorbiert. Normale Holzkohle adsorbiert ihn schon merklich, und Paraffinkohle recht gut. Im aktivierten Zustande wird er von allen Kohlenarten sehr kräftig adsorbiert, am wenigsten noch von Gelatinekohle.

Tabelle V c.

Kohlenart		20 ccm 0,1 prom. Kongorot mit					20 ccm 1 prom. Pikrinsäure mit		
		0,025 g Kohle adsorb. Proz.	0,05 g Kohle adsorb. Proz.	0,1 g Kohle adsorb. Proz.	0,2 g Kohle adsorb. Proz.	0,4 g Kohle adsorb. Proz.	0,1 g Kohle adsorb. Proz.	0,2 g Kohle adsorb. Proz.	0,4 g Kohle adsorb. Proz.
Blutkohle . .	normal	60	98				75	99	
	aktiv.	95	100				95	100	
Holzkohle . .	normal				40	70		0	0
	aktiv.		65	95				40	60
Zuckerkohle .	normal				0	0		0	0
	aktiv.	50	83	99			94	100	
Gelatinekohle	normal				0	0		0	0
	aktiv.			75	78		95	100	
Naphthalinruß	normal						0	0	
	aktiv.						85	99	
Paraffinruß .	normal		60	75			0	0	
	aktiv.		97	100			88	99	

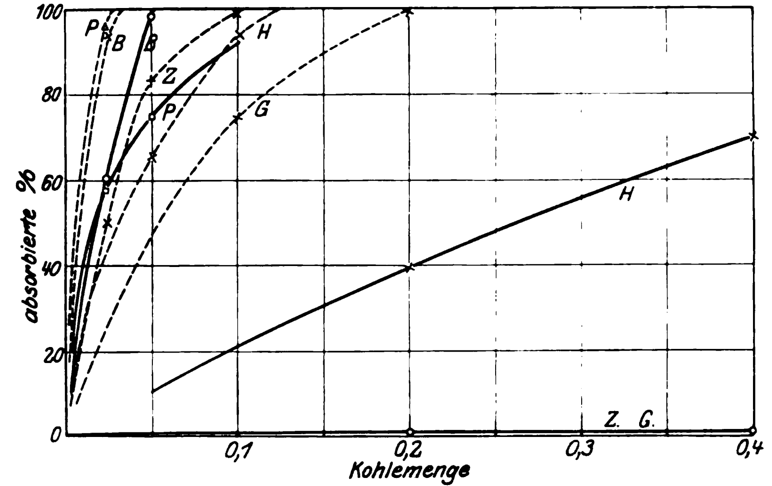


Abb. 5. Adsorption von Kongorot.
———— normale Kohle. — — — — — aktivierte Kohle.
B = Blutkohle, *H* = Holzkohle, *Z* = Zuckerkohle,
G = Gelatinekohle, *P* = Paraffinkohle.

Das allgemeine Resultat ist also, daß schon im normalen Zustande die verschiedenen Kohlenpräparate sich gegenüber möglichst nicht kolloidalen basischen und sauren Farbstoffen etwas verschieden verhalten. Die sauren Farbstoffe werden im allgemeinen weniger adsorbiert, und das geht so weit, daß bei einigen Kohlenarten saure Farbstoffe überhaupt nicht nachweisbar adsorbiert werden. Durch die Hitze-

aktivierung wird das Adsorptionsvermögen auf alle Fälle bedeutend erhöht. Ein kleiner Unterschied zwischen sauren und basischen Farbstoffen scheint aber überall bestehen zu bleiben, wenn er auch durch starke Aktivierung bedeutend verwischt wird.

Einfluß der Zerkleinerung der Kohle.

Um den Einfluß der Zerkleinerung der Kohle auf ihr Adsorptionsvermögen zu studieren, wurde folgende Versuchsreihe angesetzt. Zunächst wurde reiner Rohrzucker verkohlt und die Kohle gleichmäßig, aber relativ grob zerkleinert. Das Adsorptionsvermögen dieses Präparates für Methylenblau ist in Abb. 6, Kurve 1, dargestellt. Es ist

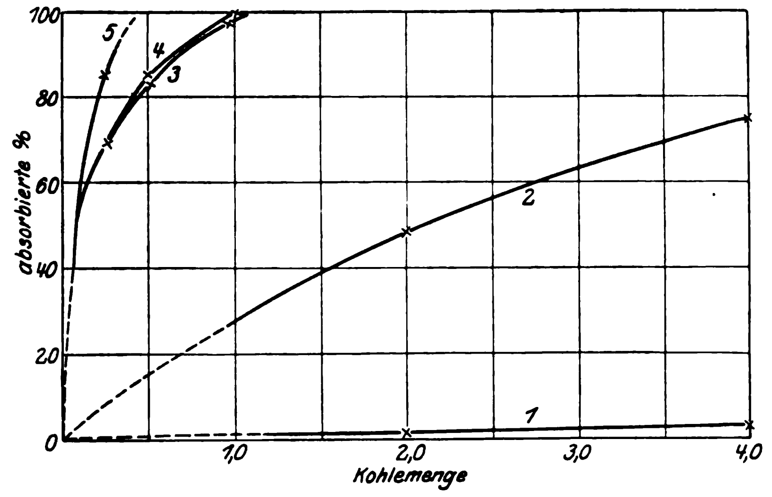


Abb. 6. Einfluß der Zerkleinerung der Kohle.

praktisch = 0. Dasselbe Kohlenpräparat wurde nunmehr möglichst zerrieben. Das Adsorptionsvermögen für Methylenblau ist in Kurve 2 dargestellt. Es ist, wie man sieht, bedeutend erhöht. Nunmehr wurde aus dem groben Kohlenpräparat durch Erhitzen eine aktive Kohle hergestellt und diese erstens ohne weitere Zerkleinerung (Kurve 3) und zweitens nach möglichst feiner Zermahlung (Kurve 4) gegen Methylenblau geprüft. Das Adsorptionsvermögen ist durch die Erhitzung nicht nur stark gesteigert worden, sondern sogar von dem Zerkleinerungszustande fast unabhängig geworden. Dies zeigt an, daß die innere Oberfläche der Kohle durch die Erhitzung so vergrößert worden ist, daß die weitere mechanische Zerkleinerung auf die Größe der wirksamen Fläche keinen Einfluß mehr hat. Offenbar sind auch die scheinbar im Innern gelegenen Kohlenteilchen einer gröberen Partikel der Benetzung mit der umgebenden Lösung durch kapillare

Spalträume hindurch zugänglich, während bei der normalen Kohle die wirksame Oberfläche durch Zerreiben immer weiter erschlossen werden kann. Am wirksamsten aber erwies sich ein Präparat (Kurve 5), welches vor der Erhitzung aufs feinste zermahlen und dann aktiviert wurde.

Adsorption von Octylalkohol.

Kohle hat von allen Adsorbentien am meisten die Fähigkeit, kapillaraktive Nichtelektrolyte aus wässeriger Lösung zu adsorbieren.

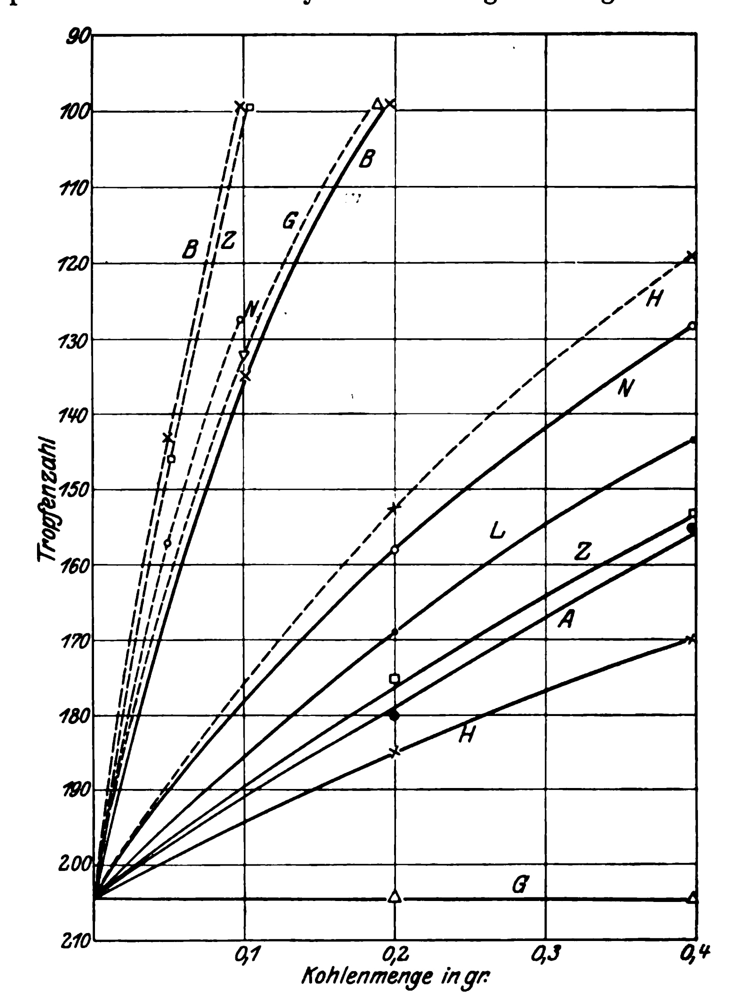


Abb. 7. Adsorption von Octylalkohol in wässeriger Lösung.
———— normale Kohle. — — — — — aktivierte Kohle.
B = Blutkohle, N = Naphthalinkohle, H = Holzkohle, A = Agarkohle, Z = Zuckerkohle, G = Gelatinekohle, L = Leberkohle.

Die folgenden Versuche beschäftigen sich mit der Frage, ob auch hierbei die verschiedenen Kohlenpräparate wesentliche Verschiedenheiten zeigen. Als Versuchsobjekt wurde eine gesättigte wässerige Lösung von Octylalkohol benutzt, die Analyse der Lösung wurde stalagmometrisch ausgeführt. Je 100 ccm der Lösung wurden mit einer Menge Kohle behandelt, welche je nach dem Adsorptionsvermögen der Kohle zweckentsprechend abgestuft war und in Abb. 7 auf der Abszisse dargestellt ist. Auf der Ordinate ist die Tropfenzahl des Filtrats angegeben, welche für reines Wasser 98 betrug. Es wurde eine einzige Kohlenart gefunden, welche Octylalkohol überhaupt nicht adsorbiert, nämlich normale Gelatinekohle. Durch Aktivieren wird das Adsorptionsvermögen bei allen Kohlenarten bedeutend gesteigert. Auch nach der Aktivierung bleibt das Adsorptionsvermögen der Gelatinekohle ein wenig hinter der der anderen zurück. Jedenfalls aber braucht man für den gleichen Effekt von der aktivierten Gelatinekohle kaum die doppelte Menge als z. B. von der aktivierten Zuckerkohle, während im normalen Zustande das Verhältnis gleich wirksamer Mengen von Gelatine- und Zuckerkohle praktisch $= \infty$ ist. Es bestehen also durchaus qualitative Unterschiede, selbst im Verhalten gegen kapillaraktive Stoffe (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Kohlenart		100 ccm gesättigte Oktylalkohollösung			
		+ 0,05 g Kohle Tropfenzahl	+ 0,1 g Kohle Tropfenzahl	+ 0,2 g Kohle Tropfenzahl	+ 0,4 g Kohle Tropfenzahl
Blutkohle (*Merck*)	normal		133	99	
	aktiviert	143	99		
Holzkohle (*Merck*)	normal			185	170
	aktiviert			152	119
Gelatinekohle	normal			205	205
	aktiviert		133	99	
Zuckerkohle	normal			175	153
	aktiviert	146	99		
Naphthalinkohle	normal			158	128
	aktiviert	157	128		
Leberkohle	normal			169	143
Agarkohle	normal			180	155

Die elektrische Ladung der Kohle.

Um die elektrische Ladung der Kohle festzustellen, wurde die Methode der Elektroendosmose angewendet, und zwar in der Form, wie sie im besonderen für die Untersuchung von Kohlenpulver von *Umetsu*[1]) beschrieben worden ist. Das Hauptinteresse bezieht sich

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 443, 1923.

auf die Frage, ob ein Kohlenpräparat durch HCl positiv geladen werden kann, während es kaum zweifelhaft sein konnte, daß jedes Kohlenpräparat gegenüber NaOH negativ ist. Für *Merck*sche Blutkohle hatte *Umetsu*[1]) gefunden, daß sie durch HCl positiv geladen wird, während dies für Zuckerkohle nicht nachgewiesen werden konnte.

Die meisten meiner Versuche wurden mit aschefreier Zuckerkohle angestellt, und zwar an normaler und an aktivierter Kohle. In einer Versuchsreihe wurde nur das Vorzeichen der Ladung festgestellt, in einer zweiten wurde die Verschiebung des Meniskus im Steigrohr genau gemessen. Da in bezug auf das Vorzeichen beide Versuchsreihen übereinstimmten, sind nur die quantitativen Versuche protokolliert (Tabelle VII). Die Zahlen geben die in 3 Minuten transportierte Wassermenge, wobei als Steigrohr eine in $^1/_{1000}$ ccm graduierte kapillare Pipette benutzt wurde. Alle 3 Minuten wurde der Strom gewendet, die angelegte äußere Spannung betrug stets 100 Volt, die Länge der Kohlensäule etwa 5 cm. Im übrigen wurden die Versuche in der von *Umetsu*[1]) beschriebenen Weise ausgeführt. Das Vorzeichen gibt den Ladungssinn der Kohle gegen die Lösung an.

Tabelle VII.

1. Versuche mit normaler Zuckerkohle.

Zeit	n/50 HCl (−)	n/500 HCl (−)	n/50 KCl (−)	n/500 NaOH (−)	n/50 NaOH (−)
0′—3′	0,0033	0,0195	0,0255	0,0312	0,0365
W					
3′—6′	0,0035	0,0170	0,0250	0,0355	0,0350
W					
6′—9′	0,0031	0,0220	0,0200	0,0300	0,0370
W					
9′—12′	0,0032	0,0195	0,0245	0,0335	0,0305
Mittel	0,0033	0,0195	0,0238	0,0326	0,0348

W bedeutet Wendung des elektrischen Stroms.

2. Versuch mit aktivierter Zuckerkohle.

Zeit	n/50 HCl (+)	n/500 HCl (+)	n/50 KCl (+)	n/500 NaOH (±)	n/50 NaOH (−)
0′—3′	0,0125	0,0070	0,0043	0,0005	0,0040
W					
3′—6′	0,0090	0,0100	0,0043	0,0005	0,0057
W					
6′—9′	0,0115	0,0075	0,0045	0,0000	0,0032
W					
9′—12′	0,0080	0,0105	0,0042	0,0000	0,0046
Mittel	0,0103	0,0088	0,0044	0,00025	0,0039

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 443, 1923.

3. Versuche mit Zucker- und Naphthalinkohle.

Zeit	Normale Zuckerkohle		Aktivierte Zuckerkohle		Naphthalinkohle	
	1 Prom. Methylenblau (+)	1 Prom. Eosin (−)	1 Prom. Methylenblau (+)	1 Prom. Eosin (−)	normal n/50 HCl (+)	aktiviert n/50 HCl (+)
0′—3′	0,0170	0,0310	0,0102	0,0205	0,0100	0,0130
W						
3′—6′	0,0135	0,0255	0,0115	0,0205	0,0105	0,0115
W						
6′—9′	0,0160	0,0300	0,0090	0,0220	0,0105	0,0135
W						
9′—12′	0,0135	0,0288	0,0110	0,0200	0,0095	0,0130
Mittel	0,0150	0,0288	0,0104	0,0208	0,0103	0,0128

Bei der normalen Zuckerkohle zeigte sich in Übereinstimmung mit *Umetsu*[1]), daß die Ladung stets negativ ist, mit steigender Ansäuerung der Lösung abnimmt, aber niemals umkehrt. Im Gegensatz hierzu ist die aktivierte Zuckerkohle nur in n/50 Natronlauge negativ, schon in n/500 Natronlauge ist die Ladung 0, und in neutraler und saurer Lösung positiv. Diese Veränderung des elektrischen Verhaltens bei der Hitzeaktivierung zeigen aufs neue die tiefgreifende Veränderung der Kohle durch die Erhitzung. Die Beteiligung irgendwelcher Aschebestandteile ist bei dieser ganz reinen Kohle ausgeschlossen. Einige weitere Versuche (die beiden letzten Spalten der dritten Versuchsreihe) wurden mit Naphthalinkohle ausgeführt. Es wurde festgestellt, daß diese sowohl im normalen wie im aktivierten Zustande durch Salzsäure positiv geladen wird. In einem unzweifelhaften Zusammenhang hiermit steht die vorher beschriebene Tatsache, daß das Verhalten der Kohlenarten bei der Adsorption von HCl und NaOH sich bei der Aktivierung ändert, obwohl ein genaues Verständnis für diesen Zusammenhang noch nicht erreichbar ist.

Schließlich wurde in einer kleinen Versuchsreihe die elektrische Ladung von Kohle festgestellt, welche mit Farbstoffen beladen ist (Tabelle VII, 3, die ersten beiden Doppelspalten). Es zeigte sich, daß sowohl normale wie aktivierte Zuckerkohle durch Methylenblau positiv, durch Eosin negativ aufgeladen wird.

Übersicht der Resultate.

1. Das hohe Adsorptionsvermögen guter Kohlenpräparate hat keine Beziehung zum Aschegehalt. Auch ganz aschefreie Kohle kann sehr kräftig adsorbieren.

2. Ganz im allgemeinen wird bei allen Kohlen das Adsorptionsvermögen für Wasserdampf und für gelöste Substanzen durch starke Erhitzung bedeutend erhöht.

[1]) l. c.

3. Selbst im stark aktivierten Zustande ist das Adsorptionsvermögen aschefreier Kohlen verschiedener Herkunft zum Teil verschieden. Das äußert sich erstens in dem verschiedenen Verhalten bei der Adsorption von HCl und NaOH und zweitens darin, daß es Kohlenarten gibt, welche durch HCl positiv geladen werden können (alle hitzeaktivierten Kohlen), und andere, welche nicht positiv werden (normale Zuckerkohle). Ferner zeigen selbst stark aktivierte Kohlenarten bedeutende Unterschiede in ihrem Verhalten gegen oberflächenaktive Substanzen.

4. Der Unterschied zwischen normalen und hitzeaktivierten Kohlenpräparaten ist nicht nur quantitativ, sondern zum Teil auch qualitativ.

Aus alledem darf man schließen, daß selbst nach starker Erhitzung die aus verschiedenen organischen Stoffen hergestellte Kohle keinen in bezug auf ihr Adsorptionsvermögen einheitlichen Stoff darstellt. Es wird eine Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, die chemische und physikalische Konstitution der verschiedenen Kohlen mit ihrem Verhalten bei der Adsorption und bei der Elektroendosmose in Zusammenhang zu bringen.

Über die Messung der Insulinwirkung.

Von

Hedwig Langecker und Wilhelm Stross.

(Aus dem pharmakologisch-pharmakognostischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 10. Juni 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei näherer Überlegung wird man der Auffassung zustimmen, daß der Fortschritt, welchen die glänzenden Resultate von *Banting* und *Best* bedeuten, nicht so sehr in der Ausarbeitung einer Methode zur Gewinnung blutzuckersenkender Pankreasextrakte (möge hierin auch ein nicht zu überschätzender praktisch therapeutischer Fortschritt gelegen sein) als vielmehr eigentlich in der Einführung der biologischen Auswertungsmethode in diesen Teil physiologischer Forschung gelegen ist. Erst die biologische Auswertung hat die Gewinnung des Insulins ermöglicht und alle weiteren Fortschritte, welche auf dem Gebiete der Insulinforschung im weitesten Sinne zu erhoffen sind, hängen von der Zuverlässigkeit der physiologischen Messungen ab.

Es hat sich nun immer mehr und mehr, je größer der Umfang der diesbezüglichen Erfahrungen geworden ist, gezeigt, daß die ursprünglich von den Torontoer Forschern geübte Methode nicht ausreichend ist, und es sind im Laufe der Zeit zahlreiche Vorschläge zur Verbesserung der biologischen Auswertung blutzuckersenkender Substanzen angegeben worden. Hierbei ist zunächst bloß an die Schwierigkeit gedacht, mit Sicherheit die blutzuckersenkende Wirkung gewisser Substanzen zu messen. Außer Betracht gelassen ist aber die Schwierigkeit, welche darin besteht, daß der Mechanismus einer beobachteten Blutzuckerkonzentrationsverminderung nicht in allen Fällen der gleiche ist, und daß somit eine noch so genau aufgenommene Blutzuckerkurve keine Gewähr dafür bietet, das wirksame Inselhormon in der Hand zu haben, eine Gewähr, welche vorher auf andere Weise geschaffen werden sollte, ehe aus Beobachtungen über Senkung der Blutzuckerkonzentration irgendwelche Schlüsse gezogen werden.

Da sich bisher das Kaninchen als Versuchstier allenthalben beinahe unumstritten behauptet hat, ist wohl anzunehmen, daß diese ursprüng-

liche Wahl der amerikanischen Forscher insofern eine glückliche gewesen ist, als andere Versuchstiere keinen Vorteil gegenüber dem Kaninchen bieten dürften. Aber das Kaninchen ist insofern ein höchst unzuverlässiges Meßinstrument, als das Ausmaß seiner Reaktion auf die parenterale Beibringung des Insulins ein weitgehend schwankendes ist, und das in einem Grade, den sich auch die mit dem Gegenstand dauernd Beschäftigten offenbar nicht immer völlig klar gemacht haben. Nun ist dieses Schwanken der Empfindlichkeit nicht etwa gerade ein Charakteristikum dem Insulin des Kaninchens gegenüber, sondern es hat im ganzen Bereich der Giftlehre Geltung. Wenn auch seine Bedeutung im Prinzip allgemein anerkannt ist, so sind zweifellos nicht immer die entsprechenden Folgerungen gezogen worden, denn sonst wären wir hinsichtlich biologischer Auswertungen überhaupt heute schon wesentlich weiter, als es, dem jetzigen Stande dieses so ungemein wichtigen Gegenstandes zufolge, der Fall ist.

I.

Wie schon einige Autoren vor uns[1]), haben auch wir uns zunächst bemüht, das Meßsubstrat: die Blutzucker-C bei unseren Kaninchen, nach möglichst vielen Richtungen hin zu definieren, und zwar nicht nur die normale Blutzucker-C hungernder Kaninchen im allgemeinen, sondern auch die des einzelnen Individuums, wenigstens nach Tunlichkeit; dann aber auch die Blutzucker-C, bei welcher für gewöhnlich der hypoglykämische Symptomenkomplex auftritt, welcher, als ein „ausgezeichneter Punkt" der pharmakologischen Wirkung, mit Recht von den Entdeckern des Insulins dadurch zur Auswertung mitbenutzt wurde, daß sie diesen Wert mit in die Festsetzung der biologischen Einheit aufgenommen haben.

Was zunächst den normalen Blutzuckerspiegel 20 bis 24 Stunden lang hungernder[2]) Kaninchen anlangt, so ergibt sich aus unseren Erfahrungen an 224 Tieren, daß er (gemessen nach *Bang II*) im Mittel

---

[1]) Z. B. *Scott* und *Ford*, Amer. Journ. of Physiol. **63**, 520, 1922/23; *Eadie*, ebenda, S. 513.

[2]) Jedem Experimentator ist es natürlich geläufig, daß unter „24 Stunden hungernden Kaninchen" nur gemeint ist, daß das Tier 24 Stunden keine Nahrung aufgenommen hat, womit bei den Herbivoren, insbesondere den Kaninchen, durchaus nicht verbunden ist ein Zustand ausgeschalteter Verdauungstätigkeit im weitesten Sinne des Wortes, wie etwa bei Carnivoren, welche nach gleicher Zeit des Nahrungsentzuges einen völlig leeren Magendarmkanal und ruhende Verdauungsdrüsen aufweisen; denn nach 24stündigem Futterentzug ist der Magen bei Kaninchen ja noch strotzend gefüllt und die Verdauung in voller Tätigkeit. Das sei besonders mit Rücksicht auf *Depisch*, *Högler* und *Ueberracks* Veröffentlichung (Klin. Wochenschr. 1924, S. 1246) gesagt, welche ein großes Gewicht auf die genaue Einhaltung des Abstandes der Injektion von dem Zeitpunkt des Nahrungsentzuges legen.

96 mg-Proz. beträgt. Dieser Mittelwert ist mit einem mittleren Fehler[1]) bzw. einer mittleren physiologischen Schwankung von 1,11 mg-Proz. behaftet. Das ihm zugrundeliegende Material sind ganz ungebrauchte Tiere und solche, welche unter den später zu erwähnenden Kautelen schon ein bis mehrere Male mit Insulin behandelt worden waren. 47 nicht vorbehandelte Tiere hatten einen Mittelwert von 99 mg-Proz., welcher mit einem mittleren Fehler von 12,2 behaftet ist. Die mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung (Standardabweichung = σ) beträgt 16,6 mg-Proz. bei den 224 Tieren. Innerhalb des Bereiches von $\pm \frac{1}{2}\sigma$ liegen 39 Proz. der Beobachtungen, innerhalb des Bereiches von $\pm 1\sigma$ 69 Proz., innerhalb des Bereiches von $\pm 2{,}7\sigma$ liegen sämtliche Beobachtungen, so daß die Verteilung dieser Werte sehr gut übereinstimmt mit der idealen Variationskurve (gefordert innerhalb des Bereiches von $\pm \frac{1}{2}\sigma$ 38 Proz., $\pm 1\sigma$ 68 Proz., innerhalb $\pm 3{,}8\sigma$ sämtliche Beobachtungen). Bei den 47 normalen Tieren betrug σ 12,5 Proz. (Mit Rücksicht auf die geringe Mittelwertsdifferenz und die Größe der mittleren Fehler der Mittelwerte können die Mittelwerte dieser beiden Serien nicht als sicher voneinander verschieden betrachtet werden.)

Man wird daher von vornherein Werte, welche unter 80 und solche, welche über 112 mg-Proz. liegen, als seltenere, solche, welche unter 65 und über 137 mg-Proz. liegen, als sehr selten ansehen können.

Andere, namentlich amerikanische Forscher (*Scott* und *Ford*, *Eadie*, l. c.) haben höhere Werte mit sehr annähernd der gleichen prozentischen Standardabweichung gefunden. Dies wird später noch diskutiert werden.

Nach unseren Erfahrungen beträgt die Standardabweichung der Einzelbestimmung nach *Bang II*[2]) $\pm$ 2,2 Proz. bei Werten über 70 mg-Proz., $\pm$ 3,8 Proz. bei Werten zwischen 40 und 70 mg-Proz., $\pm$ 5,8 Proz. bei Werten unter 40 mg-Proz., also rund 2 mg-Proz. Blutzucker. Dieses Ergebnis lieferte das Arbeiten mit n/200 Thiosulfatlösung. Bei Verwendung von n/100 Lösung wird die Standardabweichung etwas größer, nämlich 3,3 bzw. 5 und 7 Proz., was ja leicht verständlich ist (Ablesungs- und Tropfenfehler).

Man kann also im allgemeinen sagen, daß die Einer der Milligrammprozente unsicher sind. Dieser Fehler der Bestimmungsmethode ist

---

[1]) Standardabweichung $= \sigma = \pm\sqrt{\frac{\Sigma p D^2}{n}}$; mittlerer Fehler des Mittelwertes $= m = \pm\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$; mittlerer Fehler einer Differenz zweier Mittelwerte M_1 und $M_2 = m_{\text{Diff}} = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$, wobei $\Sigma p D^2$ die Summe der Quadrate der Abweichungen vom Mittel, n die Zahl der Beobachtungen bedeutet. Vgl. *Johannsen*, Elemente d. exakt. Erblichkeitslehre, 2. Aufl., Jena 1913; *Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **8**, 574, 1915.

[2]) Vgl. S. 31.

aber in Anbetracht der Größe der Individualschwankung so geringfügig, daß er nicht in Betracht kommt; es ist daher die Genauigkeit der Bang-II-Methode völlig der Definition des Objektes angepaßt.

Was die Definition des Blutzuckers ein und desselben Kaninchens anbelangt, so sind naturgemäß unsere Beobachtungen in dieser Beziehung nicht so zahlreich. Soweit sie einen Schluß zulassen, ergibt sich aber, daß das einzelne Tier einen etwas besser definierten Blutzucker hat. Darüber vergleiche Tabelle I, deren Durchschnitt gut mit den Ergebnissen *Eadies* (l. c.) übereinstimmt.

Tabelle I.
Die normale Blutzuckerkonzentration einzelner hungernder Kaninchen.

Nr. des Tieres	Zahl der Beobachtungen	Mittelwert mg-Proz.	Mittlerer Fehler der Einzelbeobachtung	
				in mg-Proz.
279	6	86,5	7,6	8,6
276	9	88,7	14,7	16,5
227	8	87,6	8,26	9,4
189	7	89,2	12,26	13,7
273	8	93	16,3	17,5
271	7	90,4	8,9	9,9
272	8	89	10,12	11,2
274	9	88,6	10,6	11,9
277	8	82	10,4	12,6
173	5	93,8	7,2	7,7
177	10	100	12,7	12,7
176	5	88,8	7,6	8,6
202	7	95,7	8,9	9,3
		Mittelwert . .	10,84	11,5

Was nun die Definition der Blutzuckerkonzentration beim Ausbruch der hypoglykämischen Krämpfe oder der als ihnen äquivalent zu bezeichnenden schweren Paresen [„Dösigsein“ von *Höyler*, *Depisch* und *Ueberrack*[1])] anlangt, so ergibt sich aus 52 Beobachtungen[2]) von

[1]) Klin. Wochenschr. 1924, S. 1246.

[2]) Diese Zahl ist im Vehältnis zu unserem sonstigen Material klein. Sie bezieht sich auf den Ausbruch der Krämpfe oder den stark ausgeprägten paretischen Zustand und ist eine Fortsetzung der früheren Zusammenstellung unseres diesbezüglichen Materials, wie sie der eine von uns zusammen mit *Wiechowski* mitgeteilt hat (Verh. d. deutsch. Ges. f. inn. Med. 1924, S. 129). Der damalige Wert war 26 mg-Proz. mit einem mittleren Fehler von 4,3 mg-Proz. Die Differenz der Mittelwerte (1,6 mg-Proz.) ist so klein im Verhältnis zu dem mittleren Fehler der Differenz der Mittelwerte (1,0 mg-Proz.), daß diese beiden Serien nicht als voneinander verschieden betrachtet werden können. Da zahlreiche Autoren über das Krampfniveau abweichende Angaben machen, worauf noch ausführlich eingegangen werden wird, sei schon hier darauf verwiesen, daß die auf S. 302 genauer angeführten späteren Befunde eine starke Stütze für die Richtigkeit unserer ersten Zusammenstellung geben.

krampfenden Tieren ein durchschnittliches Blutzuckerniveau von 27,9 mg-Proz. mit einer Standardabweichung von ± 5,7 mg-Proz. (= 20 Proz.). Hier fällt die Standardabweichung schon sehr nahe an den Fehlerbereich der Bestimmungsmethode (wie denn naturgemäß die Sicherheit der Werte bei der *Bang*schen Methode um so mehr sinkt, je kleiner sie sind). Interessant ist aber, daß sie auch hier ungefähr der des normalen Blutzuckerdurchschnittswertes gleich ist. Wahrscheinlich ist demnach, daß das Krampfniveau bei ein und demselben Tier ungefähr den gleichen Schwankungen unterworfen ist, wie der normale Blutzucker. Ferner geht das Erreichen eines bestimmten Blutzuckerniveaus bekanntlich nicht *immer* mit dem Auftreten von Krämpfen bzw. hypoglykämischen Paresen einher, sondern vielfach bleiben Krämpfe aus, und zwar selbst dann, wenn ein niedrigeres Blutzuckerniveau feststellbar ist, als das, bei dem gewöhnlich Krämpfe eintreten. In dieser Beziehung stimmen wir daher mit der ursprünglichen amerikanischen, einschränkenden Formulierung überein, die dahin lautet, daß bei einer bestimmten Blutzuckerkonzentration *für gewöhnlich* Krämpfe auftreten. Wie häufig ein bestimmter niedriger Blutzuckerwert mit Krämpfen einhergeht bzw. wie oft solche trotz niedrigem Blutzuckerniveau ausbleiben, darüber gibt die Kurve der Abb. 1 Aufschluß. Aus dieser ergibt sich, daß bei dem Blutzuckerspiegel von 26 mg-Proz. und weniger viel häufiger Krämpfe bei unseren Kaninchen auftraten als ausblieben, daß bei 32 mg-Proz. beides gleich oft vorkam und bei höherem Blutzuckerspiegel Krämpfe selten sind. Aus ihr ergibt sich ferner, daß der Blutzuckerwert, welchen die amerikanischen Autoren für diesen Zustand annehmen, ein ganz anderer, und zwar viel höherer ist, als der, den wir beobachteten. Während bei den amerikanischen Forschern gewöhnlich bei 45 mg-Proz. Krämpfe auftreten, ist das bei uns höchstens einige Male ausnahmsweise beobachtet worden, während bei uns Krämpfe im Mittel erst bei 28 mg-Proz. auftreten.

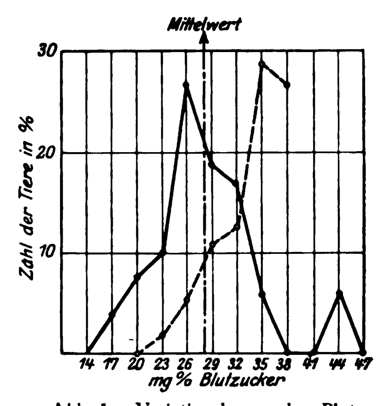


Abb. 1. Variationskurve der Blutzuckerwerte von 52 Kaninchen beim Ausbruch von Krämpfen (ausgezogene Linie) und von 56 Kaninchen, welche tiefe Blutzuckerwerte ohne Krämpfe hatten (gebrochene Linie). Die Zahlen der Abszisse bedeuten die „Klassenmitten" (s. *Johannsen*, l. c.).

Sowohl die normalen Blutzuckerwerte als auch das Niveau, bei welchem gewöhnlich der hypoglykämische Symptomenkomplex auftritt, liegen bei den amerikanischen Autoren höher als bei uns. Es fällt auf, daß die Differenzen nicht nur gleichsinnig, sondern auch ungefähr

gleich groß sind. Wir können nichts Sicheres darüber sagen, worauf diese Differenzen [die den Variationsbereich der beiden Beobachtungsreihen weit übersteigen[1])] zurückzuführen sind. Es läge nahe, an Rassenunterschiede zu denken, ebenso aber auch daran, daß die verschiedenen zur Blutzuckerbestimmung angewendeten Methoden für die Differenzen verantwortlich sein könnten. Es sei hier auf die Arbeit von *Höst* und *Hatlehol*[2]) verwiesen, aus welcher hervorgeht, daß die mit verschiedenen Methoden erhaltenen Blutzuckerwerte nicht immer ohne weiteres miteinander verglichen werden dürfen. Insbesondere die in Amerika so viel verwendeten Methoden von *Folin* und *Wu* und von *Benedict* liefern ja sehr viel höhere Werte als die untereinander gut übereinstimmenden Methoden von *Bang* und *Hagedorn*. Eigene Erfahrungen über die gegenseitige Relation der mit verschiedenen Methoden gewonnenen Blutzuckerwerte, insbesondere auch über die in der Insulinforschung so viel verwendete Methode von *Shaffer* und *Hartmann* fehlen uns. Daß aber auch die Hagedornwerte nicht ohne weiteres mit denen nach *Bang* verglichen werden dürfen, wird wahrscheinlich gemacht durch die Arbeit von *Putter*[3]), in welcher wir aus der mitgeteilten Tabelle den Durchschnitt der Normalwerte mit 111 mg-Proz. berechnet haben, während unsere Zahl, die mit der von *Bang*[4]) (100 mg-Proz. aus 40, bei uns 99 mg-Proz. aus 47 Tieren) geradezu ideal übereinstimmt, niedriger ist.

Unabhängig von der durch die Methode beeinflußten absoluten Größe der Werte zeigt also der normale, aber auch der Krampfwert des Blutzuckers hungernder Kaninchen eine Standardabweichung von rund 20 Proz., und wir dürfen daher wohl annehmen, daß auch dazwischen liegende Blutkonzentrationen, welche von mittleren Insulindosen herbeigeführt werden, etwa auf 20 Proz. genau definiert sind.

II.

Während derart das Kaninchen sich als ein hinreichend genaues Meßinstrument darstellt, wird eine Auswertung von brauchbarer Genauigkeit dadurch sehr erschwert, daß die Reaktion verschiedener Kaninchen, d. h. ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Inselhormon, eine derart schwankende ist, daß die Gewinnung halbwegs gesicherter Resultate geradezu in Frage gestellt ist. Es ist zwar seit langem bekannt, daß verschiedene Kaninchen sehr verschieden empfindlich gegen das Insulin sind, und diese bald gemachte Erfahrung hat dazu geführt,

---

[1]) Die Differenz der Mittelwerte ist rund 11 mal so groß wie der mittlere Fehler der Differenz der Mittelwerte.

[2]) Journ. of biol. Chem. **42**, 347, 1920.

[3]) Klin. Wochenschr. 1924, S. 2239.

[4]) Der Blutzucker. Wiesbaden 1913.

zahlreiche, manchmal geradezu groteske Mengen[1]) von Tieren zur Auswertung heranzuziehen, aber man macht sich für gewöhnlich kaum eine richtige Vorstellung von der Größe dieser individuellen Empfindlichkeitsschwankungen, welche, wie hier schon vorausgeschickt sei, in extremen Fällen mehrere 1000 Proz. betragen kann. Wir haben der Feststellung der Empfindlichkeitsschwankungen eine ganze Reihe von Versuchen gewidmet.

Bei solchen Versuchen kommt es darauf an zu ermitteln, welche minimale Insulindosis nötig ist, um bei einem bestimmten Kaninchen die Senkung der Blutzucker-C auf das als charakteristisch gewählte Niveau, also bei uns auf 28 mg-Proz. herbeizuführen. Diese Ermittlung erfordert, daß an einem und demselben Tiere mehrere Injektionen gemacht werden, und es ist die Voraussetzung einer solchen öfteren Injektion, daß die Tiere ihre Individualempfindlichkeit mehr oder minder genau beibehalten —, nur dann sind die Schlüsse, die man aus derartigen Versuchsergebnissen ziehen kann, gesichert.

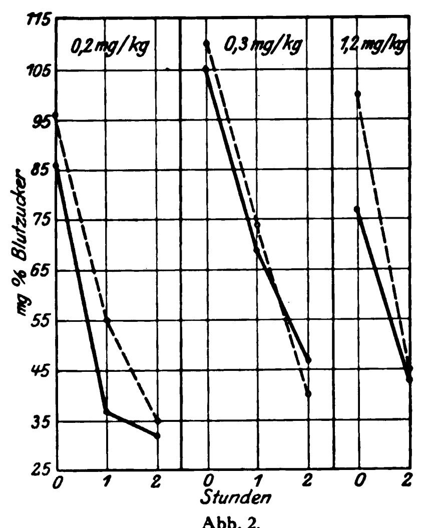


Abb. 2.
Beispiele für die individuelle Empfindlichkeitskonstanz bei mittleren Insulindosen. Testpräparat Nr. 1. Drei Tiere, erste Injektion ausgezogene, zweite Injektion (nach 10 Tagen) gestrichelte Linie. Man beachte hier und in Tabelle II, wie verschieden empfindlich die verschiedenen Tiere sind.

In dieser Beziehung haben uns Versuche, von denen einige prägnante wiedergegeben seien (Abb. 2 und Tabelle II) die nötige Sicherheit

Tabelle II.
Beispiele der Empfindlichkeitskonstanz nach mittleren Dosen.

Nr. des Tieres	Datum	Blutzucker in mg-Proz.				Testpräparat Nr. 1
		Normal	1 Std.	2 Std.	3 Std.	mg pro kg
173	5. II.	99	46	49	—	0,15
	20. II.	96	47	46	—	
202	21. II.	94	50	51	60	0,3
	3. III.	104	51	51	56	
177	29. III.	104	41	47	—	0,3
	9. IV.	87	41	47	—	
177a	8. III.	92	28	39	—	0,3
	19. III.	122	32	39	—	

[1]) *Walters* (Journ. of Endocrinology 5, 661, 1923) verwendet zur Auswertung einer Fabrikationscharge bis zu 500 Kaninchen.

Tabelle III. Unterschiedsempfindlichkeit der Kaninchen der ganzen und über einer ganzen und halben wirksamen Dosis unseres Testpräparates mg-Proz. 2 Stunden nach

Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg	
	0,025	0,0125		0,05	0,025		0,1	0,05		0,2	0,1
123	27	55	265	Kr[3])	59	140	Kr	38	138	Kr	36
—	—	—	146	Kr	62	95	Kr	53	155	Kr	63
—	—	—	51	Kr	40	43	Kr	32	160	Kr	41
—	—	—	58	Kr	45	263	Kr	38	148	28	78
—	—	—	85	Kr	68	267	Kr	42	260	Kr	57
—	—	—	85	Kr	68	130	Kr	36	279	Kr	35
—	—	—	85	Kr	55	104	Kr	54	110	Kr	38
—	—	—	52	27	39	146	Kr	35	60	Kr	35
—	—	—	22	Kr	51	51	Kr	49	121	Kr	39
—	—	—	120	Kr	55	289	Kr	38	291	Kr	41
—	—	—	—	—	—	157	Kr	41	89	Kr	35
—	—	—	—	—	—	83	Kr	35	88	Kr	45
—	—	—	—	—	—	126	Kr	46	81	Kr	51
—	—	—	—	—	—	126	Kr	60	206	Kr	75
—	—	—	—	—	—	61	25	35	127	Kr	47
—	—	—	—	—	—	22	Kr	70	130	Kr	35
—	—	—	—	—	—	22	Kr	38	132	Kr	36
—	—	—	—	—	—	120	Kr	36	215	Kr	43
—	—	—	—	—	—	120	30	39	82	23	35
—	—	—	—	—	—	156	22	39	126	Kr	38
—	—	—	—	—	—	162	Kr	42	223	Kr	32
—	—	—	—	—	—	162	28	44	67	Kr	38
—	—	—	—	—	—	173	22	33	67	Kr	41
—	—	—	—	—	—	204	30	52	61	Kr	35
—	—	—	—	—	—	211	20	43	61	Kr	35
—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	Kr	41
—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	29	58
—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	Kr	43
—	—	—	—	—	—	—	—	—	105	Kr	32
—	—	—	—	—	—	—	—	—	120	32	51
—	—	—	—	—	—	—	—	—	120	Kr	53
—	—	—	—	—	—	—	—	—	125	Kr	31
—	—	—	—	—	—	—	—	—	125	Kr	50
—	—	—	—	—	—	—	—	—	138	27	60
—	—	—	—	—	—	—	—	—	145	24	46
—	—	—	—	—	—	—	—	—	152	Kr	41
—	—	—	—	—	—	—	—	—	152	Kr	43
—	—	—	—	—	—	—	—	—	162	Kr	36
—	—	—	—	—	—	—	—	—	162	Kr	54
—	—	—	—	—	—	—	—	—	187	Kr	45
—	—	—	—	—	—	—	—	—	191	Kr	54
—	—	—	—	—	—	—	—	—	204	Kr	41
—	—	—	—	—	—	—	—	—	209	Kr	43
Mittelwert f. d. halbe „krampfmachende Dosis"					54,2	—	—	42,7	—	—	44,4

[1]) Der mit dem Testpräparat Nr. 1 gewonnene kleinere Teil der Werte ist präparates Nr. 2. — [2]) Die an dieser Stelle angeführte Dosis ist nicht die „krampf- geschaltet und keine weiteren Werte bei ihnen bestimmt. — [3]) Kr bedeutet Krämpfe.

halben „krampfmachenden“, bzw. bei wenig empfindlichen Tieren gegen-
Nr. 2[1]). Als Wirkung ist wie immer die Blutzucker-C, ausgedrückt in
der Injektion angesehen.

Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg		Nr. des Tieres	Wirkung von mg pro kg	
	0,4	0,2		0,4[2])	0,2		0,6	0,4		0,6	0,3
98	Kr	34	106	42	60	97	Kr	50	231	39	60
66	Kr	36	124	44	58	59	Kr	37	231	35	—
148	30	37	135	39	47	59	Kr	34	—	—	—
53	Kr	39	137	41	46	59	Kr	38	—	—	—
148	Kr	37	137	36	54	201	Kr	43	—	—	—
274	Kr	38	138	35	50	—	—	—	—	—	—
131	Kr	43	143	37	48	—	—	—	—	—	—
271	30	51	149	33	38	—	—	—	—	—	—
151	Kr	58	149	44	57	—	—	—	—	—	—
276	Kr	51	166	50	47	—	—	—	—	—	—
208	Kr	45	131	33	41	—	—	—	—	—	—
272	Kr	49	186	45	50	—	—	—	—	—	—
281	Kr	51	189	48	54	—	—	—	—	—	—
210	Kr	38	192	49	43	—	—	—	—	—	—
205	Kr	35	—	—	—	—	—	—	—	—	—
161	Kr	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—
105	Kr	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—
83	Kr	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—
87	Kr	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—
109	Kr	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
150	Kr	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—
106	Kr	37	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	Kr	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—
105	Kr	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
124	Kr	51	—	—	—	—	—	—	—	—	—
125	30	54	—	—	—	—	—	—	—	—	—
133	Kr	46	—	—	—	—	—	—	—	—	—
133	Kr	48	—	—	—	—	—	—	—	—	—
140	Kr	39	—	—	—	—	—	—	—	—	—
147	Kr	66	—	—	—	—	—	—	—	—	—
148	Kr	81	—	—	—	—	—	—	—	—	—
156	30	56	—	—	—	—	—	—	—	—	—
188	Kr	51	—	—	—	—	—	—	—	—	—
202	Kr	42	—	—	—	—	—	—	—	—	—
207	Kr	65	—	—	—	—	—	—	—	—	—
209	Kr	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—
211	Kr	36	—	—	—	—	—	—	—	—	—
277	Kr	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—
277	Kr	48	—	—	—	—	—	—	—	—	—
277	Kr	52	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	45,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—

ür die Zwecke dieser Tabelle ausgedrückt in den entsprechenden Werten des Test-
achende“. Die Tiere wurden als zu unempfindlich für die Auswertungen aus-
her eine Blutzuckerkonzentration von 28 mg-Proz., ± 5,7 mg-Proz., siehe oben.

gegeben. Ehe aber auf das Ergebnis dieser Untersuchung eingegangen werden kann, ist die Frage zu diskutieren, in welcher Weise die Blutzuckersenkung beim Kaninchen eine Funktion der verabreichten Insulindosis ist bzw. wie bei Steigerung der Insulindosis an einem und demselben Tier sich der Blutzucker verhält. Diese Abhängigkeit des Reizeffektes von der Reizgröße ist bei den einzelnen Kaninchen durchaus nicht konstant. Abgesehen davon, daß das Meßbereich, in Anbetracht der immerhin mangelhaften Definition jedes Blutzuckerwertes zwischen 96 und 30 mg-Proz. ein relativ geringfügiges ist, so daß es schwer hält, mehrere genügend abgestufte Insulindosen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu prüfen, hat sich ergeben, daß die Unterschiedsempfindlichkeit gegenüber steigenden Insulindosen bei verschiedenen Kaninchen sehr ungleich ist. Es kommen Tiere vor, bei welchen die Steigerung einer mittleren, nicht Krämpfe machenden Insulindosis auf das Doppelte den gleichen Blutzuckerwert ergibt, wie die einfache Dosis.

Als Beispiel für dieses besondere Verhalten, das wir in so prägnanter Form zehnmal beobachtet haben, sei ein Versuch angeführt: Kaninchen Nr. 143 erhielt von einem Präparat 0,2 mg pro Kilogramm und zeigte nach 2 Stunden eine Blutzuckerkonzentration von 48 mg-Proz. Nach 10 Tagen erhielt es (frisch eingewogene Lösung) 0,4 mg des gleichen Präparats und zeigte eine Blutzuckerkonzentration von 49 mg-Proz. Tiere, bei denen ein derart torpides Verhalten festgestellt wurde, haben wir zur Auswertung nicht benutzt. Andere Tiere aber reagieren recht empfindlich auf eine Steigerung der Insulindosis. Schon aus diesem Verhalten der Tiere ergibt sich, daß die minimale Insulindosis, welche die Blutzucker-C auf das dem hypoglykämischen Effekt entsprechende Niveau von 26 mg-Proz. herabdrückt, sich durchschnittlich nicht genauer ermitteln läßt als durch Abstufung der Dosen in einer geometrischen Reihe mit dem Faktor 2. Selbst bei den gut reagierenden Tieren ist eine Steigerung der Wirkung bei Steigerung der Dosis auf das Doppelte kaum jemals so erheblich, daß man mit Rücksicht auf die Größe der Standardabweichung des Wertes jeder Blutzucker-C eine sichere Abstufung von dazwischen gelegenen Dosen erhoffen könnte.

Unsere Erfahrungen über die Relation zwischen der Wirkung der halben und der ganzen Minimaldosis finden sich ausführlich in der Tabelle III.

Es hat sich nun leider ergeben, daß die individuelle Empfindlichkeit des einzelnen Kaninchens doch nicht ganz so genau definiert ist[1]),

[1]) Diese relative Konstanz der individuellen Empfindlichkeit ist auch schon von anderen Autoren bemerkt und gelegentlich ausgesprochen worden (z. B. *Dudley*, Biochem. Journ. **17**, 376, 1923), wurde aber unseres Wissens noch nie systematisch zur Verbesserung der Auswertungsmethode ausgenutzt.

wie es sich aus den ersten Versuchsreihen ergeben hatte, die der eine von uns in Kissingen[1]) mitgeteilt hat, wenn wir auch noch immer glauben, daß die aus jenen Befunden für die Praxis der Auswertung gezogenen Konsequenzen trotz dieser teilweisen Einschränkung einer rationellen Auswertungsmethode zugrundegelegt werden müssen.

Im Verlaufe der weiteren zahlreichen Versuche ergab sich nämlich, daß immerhin ein gewisses Schwanken der individuellen Empfindlichkeit eintreten kann, wenn den Tieren, um die minimale „krampfmachende Dosis"[2]) zu ermitteln, in einer geometrischen Reihe mit dem Faktor 2 abgestufte Insulinmengen injiziert werden.

Über Häufigkeit, Grad und Richtung der Abweichungen von der Regel der individuellen Empfindlichkeitskonstanz unterrichtet die Tabelle IV, welche alle unsere diesbezüglich verwertbaren Beobachtungen zusammenfaßt.

Tabelle IV.

Übersicht über die individuelle Empfindlichkeitskonstanz.

Von 119 Tieren waren:

Konstant	Einfach*) überempfindlich	Zweifach überempfindlich	Einfach unterempfindlich	Zweifach unterempfindlich
52 = 43 Proz.	32 = 27 Proz.	4 = 3 Proz.	29 = 24 Proz.	2 = 1,7 Proz.

*) Einfach überempfindlich heißt, daß das Tier um ein Glied der Reihe mit dem Faktor 2 überempfindlich geworden ist.

Aus dieser Stastistik ist zu ersehen, daß die individuelle Empfindlichkeit im Rahmen der einer geometrischen Abstufung mit dem Faktor 2 entsprechenden 100proz. Fehlerbreite ziemlich konstant bleibt, da die Tiere, bei denen die Empfindlichkeit in höherem Maße schwankte, nur die Ausnahmen bilden (3 Proz. nach oben und 1,7 Proz. nach unten). In Anbetracht dessen, daß wir nie genauer als mit dem Faktor 2 geometrisch abgestuft die Empfindlichkeit unserer Tiere bestimmt haben, können wir diese Resultate wohl als eine Bestätigung unserer früheren Angaben ansehen.

Allerdings kann man doch nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen, auf die weiter unten näher eingegangen wird, mit einer solchen individuellen Konstanz der Insulinempfindlichkeit der Kaninchen rechnen.

---

[1]) *Stross-Wiechowski*, Verh. d. d. Ges. f. i. Med. 1924.

[2]) Wir bedienen uns der Kürze wegen hier und im folgenden des Ausdrucks „krampfmachende Dosis" für jene geringste Insulinmenge, die eine Blutzuckersenkung auf dasjenige Niveau bewirkt, bei welchem in der Regel typische hypoglykämische Symptome auftreten, das war in unseren Versuchen 28 ± 5,7 mg-Proz. Die oberste, der „krampfmachenden Dosis" entsprechende Blutzucker-C beträgt demnach 34 mg-Proz.

Wir haben also in den zulässigen Zeitabständen bei den einzelnen Tieren jene Menge eines einheitlichen, in größerem Vorrat dargestellten Insulintrockenpräparates ermittelt, welche eben Krämpfe oder eine Blutzuckersenkung auf das Krampfniveau herbeiführte. Dabei fanden wir, daß die Kaninchen, wie gesagt, individuell in sehr weiten Grenzen gegen Insulin verschieden empfindlich sind. In der folgenden Tabelle V ist die Empfindlichkeit von 175 Tieren ausgedrückt in der minimalen pro Kilogramm „krampfmachenden Dosis".

Tabelle V.
Übersicht über die individuelle Insulinempfindlichkeit von 176 Kaninchen.

Minimale „krampfmachende Dosis" des Testpräparates Nr. 2 pro kg Kaninchen mg	Zahl der Tiere	Zahl der Tiere Proz. aller	Minimale „krampfmachende Dosis" des Testpräparates Nr. 2 pro kg Kaninchen mg	Zahl der Tiere	Zahl der Tiere Proz. aller
0,025	1	0,6	0,4	48	27,2
0,05	18	10,2	0,6	8	4,5
0,1	31	17,6	größer als 0,4*)	11	6,2
0,2	52	29,6	„ „ 0,6*)	1	0,6
0,3	6	3,4			

*) Bei diesen Tieren wurden höhere Dosen nicht mehr verabreicht.

Aus der Tabelle V ergibt sich, daß sich die verschiedenen Empfindlichkeiten zwar nicht gleichmäßig auf die einzelnen Dosen verteilen, daß man aber andererseits auch nicht von einer Dosis sprechen kann, bei der die absolute Mehrzahl der Tiere krampfen bzw. den Blutzuckerwert von rund 28 mg-Proz. haben. Nach der Dosis von 0,2 mg zeigten relativ die meisten Tiere die charakteristische Reaktion, aber das waren nur 29,7 Proz. Dieser Umstand ist, wie wir noch sehen werden, für die Bewertung eines Insulinpräparates[1]) von größter Wichtigkeit.

Mit Rücksicht darauf, daß in der Literatur häufig die Frage diskutiert wird, ob der „hypoglykämische Komplex" mit der Hypoglykämie in der Tat in einem festen Zusammenhang steht, sei auch unsere Meinung über diese Frage dargelegt, obwohl wir ihr keine speziellen Untersuchungen gewidmet haben. Dieser Zusammenhang schien den Entdeckern des hypoglykämischen Komplexes wohl geradezu selbst-

[1]) Was die absoluten hier verwendeten Insulinmengen pro Kilogramm anlangt, so sei hervorgehoben, daß es sich um ein verhältnismäßig unreines Präparat handelte, welches wir nur aus dem Grunde als Vergleichspräparat beibehalten hatten, weil viel davon vorhanden war und die Umstellung auf ein anderes Vergleichspräparat mit großem Aufwand von Zeit und Tiermaterial verbunden gewesen wäre. Wir sind daher bei diesem Vergleichspräparat geblieben, wiewohl wir heute über weit reinere Präparate verfügen bzw. die von der einen von uns mitgeteilte Methode (*Langecker* und *Wiechowski*, Klin. Wochenschr. 1925, S. 1339) konstant zu Präparaten von der Reinheit von 0,05 mg pro 1-kg-Einheit führt.

verständlich, worin sie durch die bekannten Befunde von *Mann* und *Magath* und *Fischler* bestärkt werden mußten. Die von manchen Autoren [z. B. *Laqueur*[1]), *Putter* (l. c.), dort auch andere Literaturangaben] an dem ursächlichen Zusammenhang geäußerten Zweifel basieren (soweit die Argumente aus der eigentlichen Sphäre der Insulinforschung — und nur diese sollte zunächst herangezogen werden[2]), entnommen werden), zum Teil auf der Beobachtung, daß die Insulinkrämpfe keineswegs immer bei einem niedrigen Blutzuckerniveau ausbrechen, sondern gelegentlich auch bei nur wenig erniedrigten, ja sogar normalen Werten. Demgegenüber müssen wir betonen, daß wir bei krampfenden Tieren, soweit wir von ihnen Blutzuckerwerte zur Zeit des Krampfausbruches bestimmt haben, ausnahmslos niedrige Blutzuckerwerte gefunden haben, meist, wie oben angegeben, höchstens 30 mg-Proz., niemals aber mehr als 45 mg-Proz. Ja, unsere sämtlichen 2-Stunden-Werte von Tieren, welche nach diesem Zeitpunkt, aber innerhalb von 5 Stunden nach der (subkutanen) Injektion gekrampft haben, bewegten sich innerhalb dieses Rahmens. Auch von denjenigen Tieren, welche später als 5 Stunden nach der Injektion Krämpfe bekamen, hatte ein Teil schon 2 Stunden nach der Injektion dem Krampfniveau entsprechende Werte (vier Tiere, Krampfzeit 7 bis 9 Stunden post inject.; 2 Stunden-Werte 27 bis 31 mg-Proz.). Der Durchschnitt der 2-Stunden-Werte von 74 Tieren, welche später Krämpfe bekamen, ist 33,2 mg-Proz. In diesem Durchschnitt sind zwölf höhere Werte (zwischen 35 und 60 mg-Proz.) enthalten, welche Tiere betreffen, die erst zwischen 5 und 9 Stunden post injektionem Krämpfe bekamen. Daß bei so großem Zeitabstande die 2-Stunden-Werte nichts über das Blutzuckerniveau zur Zeit der Krämpfe aussagen, ist klar. Trotzdem ist die Durchschnittszahl eine so niedrige!

Unter dem immerhin nicht geringen Material befindet sich bloß 1 Tier, welches $\frac{1}{4}$ Stunde vor dem Ausbruch von Krämpfen den relativ hohen Blutzuckerwert von 46 mg-Proz. aufweist.

Soweit bei unseren Auswertungsversuchen auf die Krampfzeit geachtet worden ist, ergeben sich die in der folgenden Tabelle VI zusammengestellten Zeiten des Auftretens von Krämpfen bei Tieren, welche die minimale „krampfmachende“ Dosis erhalten hatten.

Ferner haben wir auch mit reineren Insulinpräparaten eigentlich niemals Krämpfe gesehen, die sich durch (unter Umständen wiederholte) Zufuhr von Glucose nicht hätten beherrschen lassen. Aufgefallen

---

[1]) *Grevenstuck* und *Laqueur*, Insulin, S. 171. München 1925.

[2]) Der singuläre Fall von *Parnas* und *Wagner* (Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **25**, 361, 1921) ist viel zu wenig geklärt, als daß man ihn für die Diskussion verwerten könnte.

Tabelle VI.

Übersicht über das zeitliche Auftreten von Krämpfen nach der minimalen „krampfmachenden Dosis" bei 173 Tieren.

Krampfzeit Stunden nach der Injektion	Zahl der Tiere	Zahl der Tiere in Proz. aller	Krampfzeit Stunden nach der Injektion	Zahl der Tiere	Zahl der Tiere in Proz. aller
1	4	2,3	6	7	4
2	76	44	7	5	2,9
3	36	20	8	5	2,9
4	23	13	9	1	0,5
5	16	9			

ist uns, daß wir, je reiner unsere Präparate wurden, im Verhältnis zu der Häufigkeit von Krämpfen immer seltener die schon mehrfach erwähnten schweren Paresen („Dösigsein") beobachteten. Früher sahen wir schwere Paresen nicht viel seltener auftreten als Krämpfe, in letzter Zeit bestehen die hypoglykämischen Symptome eigentlich nur mehr aus Krämpfen (zwischen deren einzelne Anfälle sich komatöse Zustände einschieben können, wie das schon oft beschrieben worden ist).

Diese beiden Faktoren: Stets niedriger Blutzuckerspiegel im hypoglykämischen Symptomenkomplex (umgekehrt nicht immer, wie schon ausgeführt) und vollkommene Beherrschbarkeit des Komplexes durch Glucosezufuhr (während andere Zucker nach der Mitteilung von *Noble* und *Macleod*, Amer. Journ. of Physiol. 64, 547, 1923, dazu in viel geringerem Grade befähigt sind) machen einen Zusammenhang zwischen den beiden Phänomenen doch sehr wahrscheinlich. Er wird noch wahrscheinlicher, wenn man in Betracht zieht, daß *reinen* Insulinpräparaten im Gegensatz zu anderen Hormonen so ungemein wenige „organotropen" Wirkungen zukommen (darüber siehe *Langecker* und *Wiechowski*, l. c.).

Fragt man nun nach der Ursache dieser auffälligen Diskrepanz zwischen unseren Befunden betreffs der Höhe des Blutzuckerspiegels im hypoglykämischen Zustand und denen anderer Autoren, so ist es wohl recht unwahrscheinlich, daß Verschiedenheiten des Kaninchenmaterials an solchen großen Differenzen schuld sein könnten (während dieser Faktior bei kleineren Differenzen vielleicht eher in Betracht kommen könnte). Es liegt wohl näher, diesen Unterschied auf Rechnung von Verschiedenheiten der verwendeten Insuline zu setzen und die Frage zu erörtern, ob nicht Verunreinigungen des jeweils verwendeten Insulins für die auffälligen (auch nach den Angaben der genannten Autoren immerhin nur die Ausnahme bildenden) Differenzen verantwortlich zu machen sind. Dazu würde sehr gut stimmen, daß z. B. die von einem Autor (*Putter*) verwendeten Präparate um ein Viel-

faches unreiner waren als die unseren (Milligramme bei *Putter*, Dezimilligramme bei uns). Ferner ist auf die Mitteilungen von *Fisher*[1]) und *Laqueur* und *Grevenstuck*[2]) über die Antiinsulinfraktion zu verweisen, eine mit 50proz. Alkohol fällbare Fraktion, welche Krämpfe bei normalem oder erhöhtem Blutzucker macht. Ihr etwaiges Vorhandensein in den fremden, ihr etwaiges Fehlen in unseren Präparaten wäre eine gute Erklärung der besprochenen Diskrepanzen. Es kann allerdings nicht verschwiegen werden, daß in unserem Institute im Gange der Darstellung des Insulins sehr häufig auch sämtliche verworfene Fraktionen auf ihre Blutzuckerwirkung hin untersucht wurden und dabei eigentlich niemals eine Fraktion sich finden ließ, welche der Antiinsulinfraktion des genannten Autors entsprochen hätte, wie noch in einer späteren Publikation der einen von uns ausführlich dargelegt werden wird.

Auch das nicht so seltene Ausbleiben von Krämpfen (s. Kurve Abb. 1) bei einem Blutzuckerwert, bei welchem sie in anderen Fällen auftreten, ist kein entscheidendes Argument gegen einen Zusammenhang zwischen Krämpfen und Hypoglykämie. Abgesehen davon, daß es dieselben Insulinpräparate waren, bei welchen die Krämpfe bei gleichem Blutzuckerniveau einmal ausbleiben und einmal auftreten, weisen auch nicht selten Tiere durch mehrere Stunden einen gleichmäßig tiefen, eigentlich im Bereich der Fehlergrenzen der Zuckerbestimmung praktisch konstanten, Blutzuckerspiegel auf und erst spät brechen, ohne deutliche Änderung des Blutzuckerniveaus, plötzlich Krämpfe aus (auf die größere Ungenauigkeit der Blutzuckerbestimmung, wenigstens der nach *Bang*, bei sehr niedrigen Blutzuckerwerten sei jedoch hier nachdrücklich hingewiesen). Nach unseren Erfahrungen ist überhaupt bei größeren als mittleren Dosen und subkutaner Injektion der Verlauf der Blutzuckerkurve nur ungefähr während der ersten Stunde ein steiler. Trotzdem ist man natürlich niemals sicher, wirklich das Minimum der Kurve bei nicht unmittelbar aufeinanderfolgenden Blutentnahmen getroffen zu haben, und wenn, wie es scheint, die Schwelle für den Eintritt des Krampfanfalls recht fein abgestuft wäre, so könnte dies schon eine gewisse Erklärung für die relative Inkonstanz des Krampfeintritts abgeben, ganz abgesehen davon, daß noch andere Momente dabei mitbestimmend einwirken könnten (Steilheit des Abfalls, Dauer des Verharrens auf einem bestimmten Niveau und anderes mehr). Ob bei den von den unserigen abweichenden Befunden *Putters* die von ihm geübte intravenöse Injektion eine wesentliche Rolle spielt, können wir nicht beurteilen.

---

[1]) Amer. Journ. of Physiol. **67**, 59.

[2]) l. c.

Das Moment des Abfalls der Blutzucker-C sei hier deshalb erörtert, weil einzelne Forscher [*Murlin*[1])] die Größe des absoluten Abfalls, andere wiederum [z. B. *Löwe*[2])] den Abfall, ausgedrückt in Prozenten des Ausgangswertes, der Auswertung zugrundegelegt haben. Wir haben einen Teil unseres Materials auch auf diese beiden Weisen durchgerechnet, ohne daß uns ein besonderer Vorteil damit verbunden schien, d. h. ohne daß die einzelnen Versuche untereinander besser überein gestimmt hätten. So ergibt sich z. B. bei der Durchrechnung derjenigen Versuche, aus welchen wir die Verteilungskurve der Blutzuckerwerte im Krampfstadium gewonnen haben, daß Krämpfe auftreten bei einem durchschnittlichen absoluten Abfall um 62 mg-Proz., welcher Wert mit einer Standardabweichung von $\pm$ 16,5 Proz. behaftet ist bzw. bei einem durchschnittlichen Abfall auf 31 Proz. des Ausgangswertes, wobei die Standardabweichung auch $\pm$ 16 Proz. beträgt. Da diese beiden Ausdrucksweisen keine besonderen Vorteile bieten, so sind wir dabei geblieben, der Auswertung den absoluten erreichten Blutzuckerwert zugrundezulegen.

Wenn es auch prinzipiell wünschenswert wäre, in jedem einzelnen Versuch eine genaue Blutzuckerkurve mit möglichst vielen Werten aufzunehmen, so ist dies doch praktisch nicht durchführbar. Nach unseren Erfahrungen ist wohl der 2-Stunden-Wert derjenige, mit welchem man nach subkutaner Injektion nicht unter mittleren Dosen dem wirklichen Minimum bei der großen Mehrzahl der Tiere recht nahe kommt. Wir beschränken uns daher für die Praxis der Auswertung im allgemeinen auf diesen Wert.

Ebenso wie Kaninchen zeigen Mäuse enorme individuelle Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber dem Insulin. Aus diesem Teil unserer Untersuchungen sei bloß der folgende Versuch mitgeteilt. Sieben Reihen von je 15 Mäusen wurden entsprechend steigende Dosen eines und desselben Präparats intraperitoneal injiziert.

Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.
Übersicht über die individuelle Insulinempfindlichkeit von weißen Mäusen.

Dosis pro 20 g Maus des Testpräparates Nr. 1 mg	Von je 15 Tieren hatten Krämpfe	Dosis pro 20 g Maus des Testpräparates Nr. 1 mg	Von je 15 Tieren hatten Krämpfe
0,00187	0	0,0075	6
0,0028	4	0,011	13
0,0037	5	0,015	15
0,0056	4		

Dieses Testpräparat hatte eine durchschnittliche Wirksamkeit von 0,6 mg pro Kilogramm Kaninchen.

[1]) Amer. Journ. of Physiol. 68, 140 u. 213. 1924.
[2]) Deutsch. med. Wochenschr. 1924, S. 332.

An anderen Tieren, insbesondere Katzen und Hunden, haben wir derartige Versuchsreihen nicht angestellt. Es ist jedoch, soweit sich aus der einschlägigen Literatur [insbesondere französische Autoren[1])] ergibt, höchst wahrscheinlich, daß auch Hunde sich nicht anders verhalten und daß bei ihnen ebenfalls sehr große individuelle Empfindlichkeitsdifferenzen bestehen.

Verhalten sich aber, wie man demnach wohl annehmen darf, die meisten Tiere derart gegenüber dem Insulin, so dürfte wohl auch der Mensch von dieser Regel keine Ausnahme machen, insbesondere aber auch nicht der diabetische Organismus. Sind doch auch schon völlig insulinrefraktäre Fälle von Diabetes beim Menschen bekannt geworden. Ebenso darf als wahrscheinlich gelten, daß der einzelne Mensch, wie das einzelne Kaninchen, seine individuelle Empfindlichkeit de norma konstant erhält.

Auf das eine ist in diesem Zusammenhang noch hinzuweisen: Wenn es sich bei den verschiedenen im Handel befindlichen bzw. therapeutisch verwendeten Insulinen, die ja doch schließlich nicht nach einer einheitlichen Methode dargestellt werden, nicht mit Sicherheit um eine einheitliche Substanz handelt, sondern wenn, was nicht ausgeschlossen ist, gelegentlich ein Gemenge verschiedener blutzuckermindernder Substanzen vorliegt (s. *Langecker* und *Wiechowski*, l. c.), so ist es wohl möglich, daß die Abstufung der Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber den verschiedenen Komponenten des Präparats beim Kaninchen eine andere ist als beim Menschen. In einem solchen Falle würden die am Kaninchen gewonnenen Auswertungsergebnisse nicht ohne weiteres für die Wirkung des betreffenden Präparates beim Menschen maßgebend sein.

Wenn von einer individuellen Empfindlichkeitskonstanz gesprochen wird, so kann naturgemäß nur eine Konstanz der Insulinwirkung innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite der normalen Blutzucker-C bzw. derjenigen des Krampfstadiums gemeint sein. Wir haben nicht nur für verschiedene Tiere, sondern auch für ein und dasselbe Tier die physiologischen Schwankungen (gegeben durch die Größe der Standardabweichung) des Hungerwertes ebenso wie die des Krampfwertes mit rund $\pm$ 20 Proz. gefunden und demgemäß geschlossen, daß bei der Reproduktion einer bestimmten, zwischen Hunger- und Krampfwert gelegenen Blutzucker-C ebenfalls mit rund $\pm$ 20 Proz. Schwankungen zu rechnen ist. Die individuelle Empfindlichkeitskonstanz ist also auf $\pm$ 20 Proz. genau definiert. Trotz dieser relativ großen Genauigkeit ist aber eine genauere Titration als die von uns gewählte, welche bloß die Wirkung von geometrisch mit dem Faktor 2

[1]) *Desgrez*, *Bierry* und *Rathery*, C. r. soc. biol. **89**, 473, 1923.

abgestuften Dosen feststellt, — also eine Titration, die zu Ergebnissen führen würde, welche genauer als auf 100 Proz. definiert wäre, nicht möglich. Dies ist eine Folge der sehr mangelhaften Unterschiedsempfindlichkeit des Kaninchens gegenüber näher aneinanderliegenden Insulindosen. Die Unterschiedsempfindlichkeit ist, wie mitgeteilt, ebenfalls individuell innerhalb weiter Grenzen verschieden. Deshalb erscheint es praktisch undurchführbar, dadurch zu einer genaueren Titration zu kommen, daß neben der individuellen Empfindlichkeit auch noch die individuelle Unterschiedsempfindlichkeit der Tiere festgestellt wird, mit der Absicht, jene wenigen Tiere auszuwählen, bei welchen der Grad der Unterschiedsempfindlichkeit dadurch eine größere Genauigkeit der Titration ermöglichte, daß er die geometrische Abstufung der Dosen mit einem kleineren Faktor als 2 gestatten würde.

Bis zu einem gewissen Grade haben wir übrigens die Unterschiedsempfindlichkeit unserer Versuchstiere berücksichtigt. Wie aus Tabelle III hervorgeht, haben wir zumeist auch das Blutzuckerniveau nach Injektion der halben „krampfmachenden" Dosis ermittelt, und gerade aus der Wirkungsgröße dieser Dosis geht die Unmöglichkeit einer genaueren Titration hervor.

Der der halben „krampfmachenden" Dosis entsprechende Blutzuckerwert ergibt sich durchschnittlich zu 46 mg-Proz. mit einer Standardabweichung von 9,99 mg-Proz. = 22 Proz. Der Abstand dieses Wertes unter Berücksichtigung der rund ± 20 proz. Abweichung auf und ab von den gleichfalls nicht genauer definierten extremen Werten ist derartig gering, daß es geradezu ausgeschlossen erscheint, nach beiden Seiten, noch einen Wert zu interpolieren, deren jeder ebenfalls einer physiologischen Schwankung um ± 20 Proz. unterliegen könnte. Jedenfalls könnte das nur unter Opferung eines großen Tiermaterials und endloser Mühe geschehen und würde oft genug dadurch vereitelt werden, daß die zur Eichung der Tiere dann nötigen, sehr viel zahlreicheren Injektionen die schließlich doch nicht unbegrenzte Verwendbarkeit der Tiere zu frühzeitig erschöpfen würde.

Diese Schwierigkeiten aber würden noch dadurch verschärft, daß die von Zeit zu Zeit notwendige Nacheichung der Tiere sicher viel häufiger als jetzt dazu führen würde, die Resultate zu disqualifizieren. Die Nacheichung ist deshalb notwendig, weil, wie hier nochmals erwähnt sei (siehe auch Tabelle IV) betreffs der seinerzeit als Regel hingestellten individuellen Konstanz der Insulinempfindlichkeit im Laufe der Erfahrungen mit sehr zahlreichen Tieren sich herausgestellt hat, daß Ausnahmen von dieser Regel vorkommen, daß, wie ja auch sonst bei biologischen Erscheinungen, eine Minderheit eine gewisse Ausnahmestellung einnimmt.

Die im vorhergehenden näher definierte individuelle Konstanz der Empfindlichkeit ist aber nur unter Einhaltung einer Reihe von Bedingungen zu beobachten.

1. Wichtig ist die Einhaltung eines genügend langen Zeitabstandes zwischen zwei aufeinanderfolgenden Injektionen. Nachdem die durch eine Insulininjektion hervorgerufene Blutzuckersenkung, wie bekannt, nach etwa 8 Stunden spätestens wieder abgeklungen ist und dem normalen Werte Platz gemacht hat, zeigten die (allerdings wenigen) Tiere, deren Blutzuckerkonzentration wir in den nächsten Tagen weiter verfolgt haben, dann bei ausreichendem Appetit und sonst normalem Verhalten zunächst normale Blutzuckerwerte. Etwa am fünften Tage pflegte aber eine spontane Senkung des Blutzuckers einzutreten, welche von einer Überempfindlichkeit der Tiere gegen Insulin begleitet war. Diese „Reaktion“, welche mehrere Tage nach einem Insulinschlag eintritt, scheint selbst einige Tage anzuhalten. Wir verfügen durchaus nicht über ausreichende Erfahrungen, um etwas Abschließendes über dieses interessante Phänomen aussagen zu können, nicht einmal in der Richtung, ob es die Regel ist und ob es nicht etwa bedingt ist durch die Anwesenheit von Beistoffen, die mit dem Inselhormon nichts zu tun haben. Das Vorhandensein von solchen möchten wir deshalb nicht absolut ausschließen, weil wir zur Zeit gerade dieser methodischen Versuche noch mit einem Präparat gearbeitet haben, welches zwar im Vergleich mit den sonstigen Präparaten, von denen damals in der Literatur die Rede war, als relativ rein bezeichnet werden mußte, da eine Einheit in 0,6 mg enthalten war, welches wir aber heute, da unser Präparat eine 1-kg-Einheit in 0,05 mg enthält, als sehr unrein bezeichnen müssen, weil mindestens $^9/_{10}$ des Injizierten kein Insulin gewesen ist. Es wird zweifellos auch für die therapeutische Anwendung des Insulins von Bedeutung sein, diesem Phänomen in ad hoc angestellten Versuchen nachzugehen, abgesehen davon, daß es für die Physiologie des Inselapparats ganz allgemein von Wichtigkeit ist. Man muß also mindestens zehntägige Pausen zwischen zwei Injektionen verstreichen lassen, wenn man mit der individuellen Empfindlichkeitskonstanz der Tiere rechnen können soll. In der Bestimmung des normalen Hungerwertes liegt übrigens die Möglichkeit, zu erkennen, ob die Tiere ihre individuelle Empfindlichkeit wieder erlangt haben. Denn soweit unsere Erfahrungen reichen, pflegen normale Hungerwerte anzuzeigen, daß die Tiere wieder normal empfindlich geworden sind.

2. Die Gravidität scheint häufig, wenn auch nicht regelmäßig, die Insulinempfindlichkeit der Kaninchen zu erhöhen. Wir haben daher nach Tunlichkeit das Eintreten von Gravidität verhindert, dabei aber noch die Erfahrung gemacht, daß Weibchen weniger als Männchen ihre individuelle Empfindlichkeit konstant beibehalten.

So kamen wir dazu, schließlich nur Männchen zu verwenden, welche, da sie ganz unverträglich sind, in Einzelkäfigen gehalten werden müssen.

3. Die Insulinempfindlichkeit der Tiere ändert sich auch während des Wachstums bis zu dessen Abschluß. Jung in den Versuch genommene Tiere zeigen daher meist keine Konstanz, und aus diesem Grunde werden nur Tiere von 1800 g aufwärts zu Auswertungen verwendet. Wir haben es nicht für nötig gefunden, ausschließlich Tiere vom Gewicht 2000 g zu verwenden. Abgesehen davon, daß hier Rassenunterschiede zweifellos eine große Rolle spielen und das Gewicht von 2000 g bei gewissen großen Rassen unter Umständen noch einem wachsenden Tier zukommen kann, ist gerade bei den Kaninchen, welche in engen Käfigen bei Futter ad libitum gehalten werden (in unseren Versuchen stets Hafer und Heu) eine geringe Mast durchaus die Regel, und das gerade dann, wenn sie sich wohlbefinden. Es wäre daher praktisch fast unmöglich, ausschließlich Tiere von 2000 g zu benutzen. Immerhin unterscheiden sich die Tiere, die nach unseren Erfahrungen eine konstante Empfindlichkeit aufweisen, in ihrem Gewicht nicht sehr. Wir verwenden also Tiere im Gewicht von 1800 bis 2800 g, gelegentlich auch Tiere bis 3000 und 3200 g. Innerhalb dieses Gewichtsspatiums wurde das Insulin pro Kilogramm dosiert. Über die Berechtigung einer solchen Dosierungsart kann man naturgemäß verschiedener Meinung sein, ganz abgesehen von dem prinzipiellen Bedenken der Gleichsetzung des Lebendgewichts der Tiere mit ihren reagierenden Massen. Die Berechnung pro Körperoberfläche führt zu nur unbedeutenden Differenzen gegenüber der Berechnung pro Kilogramm, welche in Anbetracht der sonstigen Mangelhaftigkeit der Definition von Blutzuckerkonzentration, Insulinempfindlichkeit und Insulinunterschiedsempfindlichkeit durchaus nicht in Betracht kommen. Deshalb dürfte es auch hier keine Bedeutung haben, ob man Tiere verschiedenen Gewichts wählt und pro Kilogramm die Injektion bemißt oder nur Tiere von 2000 g und allemal die gleiche Dosis darreicht.

Manche Autoren (*Depisch, Högler* und *Ueberrack*[1])] legen gerade der Verwendung von Tieren genau gleichen Gewichts (2000 g) entscheidenden Wert für die Genauigkeit der Auswertung bei. Wenn dieser Umstand tatsächlich die von diesen Autoren angenommene Bedeutung hätte, dann müßte sich irgend eine Art von eindeutiger Beziehung zwischen Gewicht und individueller Insulinempfindlichkeit ergeben, sei es, daß die leichteren Tiere empfindlicher wären, sei es umgekehrt. Eine solche Beziehung müßte sich dann wohl auch an ein und demselben Tiere im Laufe seines Wachstums ergeben. Wir haben innerhalb der angegebenen Gewichtsgrenzen keine derartige Abhängig-

---

[1]) Klin. Wochenschr. 1924, S. 619.

keit finden können (weshalb wir auch die Angabe von *Walters*, l. c., daß die krampfmachende Dosis proportional dem Quadrate des Gewichts sei, nicht für richtig halten), ebensowenig, wie hier bemerkt sein mag, irgend eine Beziehung zwischen Rasse, Pigmentierung usw. und der individuellen Insulinempfindlichkeit[1]).

4. Auf die verschiedensten krankhaften Zustände pflegen die Kaninchen mit einer Steigerung der Insulinempfindlichkeit zu reagieren. In der genauen Kontrolle des Gewichts hat man einen brauchbaren Anhaltspunkt für das Wohlbefinden der Tiere. Sobald ein Tier an Gewicht abgenommen hat, pflegt es, was auch schon viele andere Forscher beobachtet haben, auch überempfindlich geworden zu sein und solche Tiere sind daher auszuschalten[2]). Hierher gehören auch die durch die Injektion gesetzten Infektionen, welche sich außerdem in dem Auftreten von Indurationen und käsigen Herden unter der Bauchhaut äußern. Die peinlichste Aseptis ist daher nötig, um die Tiere bei konstanter Empfindlichkeit und damit brauchbar zu erhalten. Um die Infektion nach Tunlichkeit zu vermeiden, wird die Injektionsstelle mit einem Depilatorium enthaart, mit Jodtinktur desinfiziert und es werden die Injektionsnadeln für jede Injektion frisch sterilisiert. Die Injektionsflüssigkeiten sind alle mit 0,2 Proz. Kresol versetzt. Zum Kupieren der Krämpfe haben wir, um die damit verbundene Infektionsmöglichkeit zu vermeiden und die Ohrvenen zu schonen, im allgemeinen von der intravenösen Injektion Abstand genommen und sind zu der Fütterung mit Schlundsonde (etwa 40 ccm 50proz. Glucoselösung) übergegangen, welche bis auf sehr geringe Ausnahmen sich als ausreichend und stets sehr gut bekömmlich erwies.

Bei Einhaltung der angeführten Bedingungen kann man damit rechnen, daß der größere Teil der Tiere im Rahmen der möglichen Genauigkeit der Titration seine individuelle Insulinempfindlichkeit beibehält und sich daher dazu eignet, zwei verschiedene Insulinpräparate hinsichtlich ihrer Wirksamkeit an demselben Tiere zu vergleichen. Immerhin aber begnügen wir uns mit der Einhaltung dieser Bedingungen

---

[1]) Wir halten uns selbstverständlich gegenwärtig, daß der Bezug auf die Gewichtseinheit überhaupt nur zulässig ist innerhalb eines verhältnismäßig kleinen Gewichtsspatiums, und daß bei extremen Gewichten diese Beziehung insofern nicht gilt, als die reagierende Masse langsamer wächst als das Gewicht, was mit sich bringt, daß die exzessiv schweren Tiere überempfindlich und die exzessiv leichten Tiere unterempfindlich gegenüber der mittleren pro Kilogrammdosis aller Arten von Giften sein müssen.

[2]) Deswegen ist auch eine Versuchsreihe, die den Einfluß extrem auseinander liegender Kostformen auf die Insulinempfindlichkeit feststellen sollte (Hafer und destilliertes Wasser einerseits, reine Rübenfütterung andererseits) mißlungen, da die Tiere abmagerten und deshalb überempfindlich wurden.

nicht, sondern kontrollieren von Zeit zu Zeit die einzelnen Tiere mit dem Testpräparat, wobei sich dann, wie oben bereits mitgeteilt, in der Tat mitunter eine Änderung der Empfindlichkeit (und zwar gleichmäßig nach beiden Seiten) ergibt, die dann auch wieder der ursprünglichen Empfindlichkeit Platz machen kann. Dadurch, daß eine solche Kontrolle vorgenommen wird, dürften dann alle Voraussetzungen, soweit gegenwärtig die Sachlage zu beurteilen ist, erfüllt sein, um die Wirksamkeit irgend eines Insulinpräparats an einem Kontrollpräparat verläßlich zu messen und damit mit größerer Sicherheit die Wertigkeit eines Präparats festzustellen, als es bisher unter Verwendung von Tieren, die hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit ganz und gar nicht definiert sind, möglich war. Dabei kann man nicht einmal zugunsten des bisherigen Verfahrens das Verhalten der Mehrheit einer größeren Anzahl von Tieren als das Entscheidende ansehen, denn aus der Tabelle V geht hervor, daß sich die verschiedenen Empfindlichkeiten auf eine größere Anzahl von Tieren fast gleichmäßig verteilen.

Wie sich unter solchen Bedingungen ein gutes Tier verhält, ist aus der folgenden Geschichte des Tieres Nr. 152 zu entnehmen. Es sei aber ausdrücklich betont, daß wir ein solches ideales Verhalten nur dreimal beobachtet haben.

Tabelle VIII.

Tier Nr. 152. Kennzeichen: grau meliert.

Datum der Injektion	Gewicht	Injiziertes Präparat	Dosis pro kg mg	2-Stundenwert in mg-Proz. Blutzucker
1924 6. VIII.	2210	Test	0,2	Krämpfe (34)
18. VIII.	2320	„	0,1	41
In mindestens 10tägigen Abständen die Injektion verschiedener Präparate, im ganzen 7.				
3. XII.	2630	Test	0,2	33
1925	3 Injektionen verschiedener Präparate.			
28. I.	2650	Test	0,2	31
	2 Injektionen verschiedener Präparate.			
1. III.	2490	Test	0,2	Krämpfe (32)
	2 weitere Injektionen.			
1. IV.	2450	Test	0,1	43
	Das Tier ist bis heute noch in Verwendung.			

Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß andere Tierarten ihre individuelle Empfindlichkeit besser beibehalten als das Kaninchen, von dem es überhaupt bekannt ist, daß es mit der Konstanz seiner physiologischen Größen schlecht bestellt ist, daß es ein höchst labiles Tier ist. Ein Vorteil der Verwendung anderer Tiere wäre jedenfalls nur dann ge-

geben, wenn die Konstanz der individuellen Empfindlichkeit bei ihnen größer wäre. Doch ist wohl bei sehr vielen anderen Tierarten Handhabung und Erhaltung wesentlich unbequemer als beim Kaninchen. Wir haben eigene Erfahrungen nur über das Verhalten von Mäusen.

In einer Versuchsreihe an 30 Mäusen bekam jedes Tier nach vier- bis sechsstündigem Hungern unter aseptischen Kautelen wiederholt verschiedene Dosen ein und desselben Standardpräparats (jedesmal frisch eingewogen) in fünf- bis zehntägigen Abständen (Injektion intraperitoneal, bei Krämpfen Rettung durch intraperitoneale Glucoseinjektion). Dabei war die Reaktion der einzelnen Tiere so ungemein wechselnd, daß von einer individuellen Empfindlichkeitskonstanz hinsichtlich des Auftretens von Krämpfen eigentlich überhaupt nicht gesprochen werden kann. Diese Versuche ebenso wie die auf S. 310 erwähnten anderen Mäuseversuche lassen also Mäuse zu Auswertungszwecken ungeeignet erscheinen, was damit zusammenhängen mag, daß man bei diesen kleinen Tieren naturgemäß auf wiederholte Blutzuckerbestimmungen verzichten muß und nur auf Krämpfe bzw. Paresen angewiesen ist, welche, wie oben gezeigt, auch bei entsprechend niedriger Blutzucker-C ausbleiben können.

III.

Wie auch bei anderen biologischen Wertbestimmungen, war auch im Falle des Insulins die verwendete Einheit zunächst als eine *absolute* gedacht und ist in dem Sinne, daß ein biologisches Phänomen bestimmten Ausmaßes die Grundlage der Messung bildet, im Prinzip bis heute unverändert geblieben. Zumindest ist nirgend ausgesprochen worden, daß man von der *absoluten* Definition irgendwelcher Einheit Abstand genommen hätte.

Aus dem tabellarisch angeführten Ergebnis unserer Versuche betreffend die individuelle Insulinempfindlichkeit der Kaninchen geht aber hervor, daß in diesem Spezialfall ganz besonders von einer absoluten Einheit unter gar keinen Umständen gesprochen werden kann, ja nicht einmal die Einschränkung der Definition, daß die Reaktion von der Mehrzahl der Tiere gezeigt wird, die Brauchbarkeit einer absoluten Einheit retten kann. Denn wenn auch die verschiedenen Empfindlichkeiten über einen Raum, der vom einfachen bis mindestens zum 32fachen reicht, zwar nicht gleichmäßig verteilt sind, so kann doch von einer genügend scharf ausgeprägten Majorität der Tiere, die bei einer bestimmten Dosis das Krampfniveau des Blutzuckers erreicht hätten, gar keine Rede sein. Weit mehr erweist sich also in diesem Falle als in anderen Fällen die Verwendung einer *absoluten* biologischen Einheit als unmöglich, und es ergibt sich die Notwendigkeit, eine *relative* Einheit einzuführen, genau so wie sich das bei anderen Auswertungen als un-

umgänglich erwiesen hat und wie es schließlich bei den Messungen physikalischer Art allgemein der Fall ist, mit anderen Worten: *die biologische Auswertung kann nur in einem Vergleich mit der Wirksamkeit eines Test- oder Standardpräparats bestehen* und unmittelbar bloß zu der Feststellung führen, welche Gewichtsmenge der Gewichtseinheit des Standardpräparats biologisch äquivalent ist.

Diese Überlegungen gelten übrigens auch dann, wenn einzelne Untersucher nicht derartig große Empfindlichkeitsunterschiede von Tier zu Tier, wie wir sie an unserem Material festgestellt haben, finden sollten.

Die Einheit des gewählten Standardpräparats kann nun entweder ganz willkürlich angenommen werden oder aber, und das letztere empfiehlt sich mehr, man kann versuchen, sie unter Berücksichtigung der individuellen Empfindlichkeitsschwankungen mehr oder minder genau biologisch zu definieren und auf diese Weise *eine allgemein reproduzierbare* Einheit zu schaffen. In beiden Fällen ergibt sich natürlich als Endresultat der Ausdruck der Wertigkeit des zu prüfenden Präparats in Einheiten. An der gegenwärtigen Gepflogenheit die Wertigkeit von Insulinpräparaten in Einheiten auszudrücken, ändert sich durch die Verwendung von Testpräparaten nichts. Nur die Ermittlung wird nicht schlechtweg nach der Blutzuckerwirkung, sondern nach der Blutzuckerwirkung im Vergleich mit der Wirkung eines bestimmten Präparats an demselben Tiere geschehen.

In der ursprünglichen Definition der Einheit durch die Torontoschule und in allen von ihr abhängigen, späteren Definitionen spielt der Blutzuckerwert von 45 mg-Proz. eine wichtige Rolle. Zweifellos wurde gerade dieser Wert deshalb zur Definition der Einheit benutzt, weil die Schöpfer der Definition gefunden hatten, daß gerade bei diesem Werte gewöhnlich Krämpfe auftreten, was eben das Charakteristische, die physiologische Bedeutung gerade dieses Wertes ausmacht (ihn zu einem Kardinalpunkt stempelt), nämlich daß er einen Grad von Hypoglykämie darstellt, welcher mit bestimmten Erscheinungen einhergeht. Daher ist auf diese Erscheinungen das Hauptgewicht zu legen, wiewohl sie in der Definition nur nebenbei erwähnt werden. Dies ist um so notwendiger, als, wie z. B. die erörterte Diskrepanz zwischen uns und anderen Autoren ergibt, durchaus nicht allenthalben oder bei allen Kaninchenrassen bzw. bei Verwendung aller Methoden der Blutzuckerbestimmung mit einer Blutzuckersenkung auf 45 mg-Proz. gewöhnlich Krämpfe verbunden sind. Wir haben daher sinngemäß die Einheit zunächst nicht auf den Blutzuckerwert von 45 mg-Proz., sondern auf das von uns beobachtete, für das Auftreten von Krämpfen charakteristische Blutzuckerniveau, das waren in unseren Versuchen höchstens 30 mg-Proz., eingestellt. Wir legen eben nicht etwa dem tatsächlichen

Auftreten von Krämpfen die entscheidende Bedeutung bei, was zweifellos unrichtig wäre, da viele Tiere beim Erreichen des üblichen Krampfniveaus der Blutzucker-C, ja bei noch niedrigerem Blutzuckergehalt keine Krämpfe aufweisen, sondern betrachten nur das Auftreten von Krämpfen als nach unseren Erfahrungen bei Verwendung reinerer Präparate sicheres Anzeichen einer entsprechenden Blutzuckersenkung, die aber auch ohne Krämpfe vorhanden sein kann. Die minimale Menge, welche pro Kilogramm Tier nötig ist, um diese Blutzuckersenkung herbeizuführen, erweist sich nun, wie aus der Tabelle IV hervorgeht, als höchst schwankend, als Ausdruck der erörterten Empfindlichkeitsdifferenz von Individuum zu Individuum. Es läge nun nahe, die Definition der Einheit derart vorzunehmen, daß man die Mehrheit der Tiere für ihre Größe entscheiden läßt. Aus der Tabelle geht aber hervor, daß die verschiedenen Empfindlichkeiten nicht etwa so verteilt sind, daß man als normale Empfindlichkeit die der weitaus größten Mehrzahl der Tiere ansprechen könnte. Eine absolute Mehrheit läßt sich überhaupt nicht feststellen, die am häufigsten beobachtete Empfindlichkeit kommt kaum einem Drittel aller Tiere zu. Unter diesen Umständen bleibt nichts anderes übrig, als den Durchschnitt der wirksamen Dosen der Einheitsdosis zugrunde zu legen, also sozusagen die Einheit auf ein ideales Tier einer bestimmten Empfindlichkeit zu beziehen. Wenn in der Tabelle IV, welche 175 Tiere umfaßt, einerseits diejenigen minimalen Insulinmengen addiert werden, welche pro Kilogramm Tier sich als die „krampfmachenden" Dosen gezeigt haben, und andererseits die Anzahl von Kilogrammen Tier, welche zur Verwendung gelangt ist, so ergibt der Quotient beider Zähler, daß pro Kilogramm eines solchen Riesenkaninchens, welches sich aus 175 Einzelindividuen zusammensetzt, eine Menge von 0,279 mg des ausgewählten Standards die durchschnittliche „krampfmachende" Dosis darstellt. Die Sicherheit, auf diese Weise den wirklich richtigen Durchschnittswert zu ermitteln, einen Wert, bei welchem also die individuellen Empfindlichkeitsschwankungen berücksichtigt oder, wenn man will, ausgeschaltet sind, hängt natürlich von der Verwendung einer genügenden Zahl von Individuen zur Ermittlung dieses Durchschnittswertes ab. Man kann wohl die nötige Anzahl von Individuen als diejenige definieren, deren Vermehrung zu keiner Änderung des bisher gefundenen Durchschnittswertes mehr führt. In dieser Beziehung ist mitzuteilen, daß bei Verwendung des gleichen Präparats der Wert an 111 Tieren 0,251 mg und nach Vermehrung der Zahl auf 175 der etwas höhere Wert von 0,279 mg pro Kilogramm als minimal „krampfmachende Dosis" gefunden wurde. Daß die offensichtlich geringere Empfindlichkeit der neu hinzugekommenen Tiere etwa auf jahreszeitliche Einflüsse zu beziehen ist, ist nicht ganz ausgeschlossen; doch ist die Differenz beider Werte nach

den Grundsätzen der Variationsrechnung mit Rücksicht auf die Größe des mittleren Fehlers der Werte zu klein, als daß eine jahreszeitlich bedingte Empfindlichkeitsabnahme als tatsächlich bestehend angenommen werden könnte. Hinsichtlich der Frage, ob solche Schwankungen vorkommen, verweisen wir auf einen späteren Abschnitt. Jedenfalls müßte man aber, um auch derartige Schwankungen mit zu berücksichtigen, zur Gewinnung eines nach jeder Richtung hin gesicherten Vergleichspräparates die Versuche über ein ganzes Jahr gleichmäßig verteilt ausdehnen.

Der auf diese Weise ermittelte Durchschnitt (bzw. die durchschnittliche Dosis), welche der gewählten physiologischen Einheit entspricht, ist nun hinsichtlich seiner Genauigkeit mit einem nach der bekannten Methode leicht zu ermittelnden mittleren Fehler behaftet. Der mittlere Fehler dieses Mittelwertes beträgt 0,0119 mg. Die Definition der mittleren, der Einheit entsprechenden Dosis ist also eine ziemlich genaue, nämlich auf rund $\pm$ 4 Proz. Weit ungenauer aber ist der Einzelwert definiert, da der mittlere Fehler, mit welchem die Einzelbeobachtung behaftet ist (die Standardabweichung), 0,198 = 70,9 Proz. beträgt. Dieser enorme Fehler ist zum Teil wohl auch dadurch bedingt, daß wir bei Abstufungen der Dosis mit dem geometrischen Faktor 2 arbeiten müssen. Geringere Differenzen als die um ein Glied einer so abgestuften Reihe können sich in der Tabelle also überhaupt nicht äußern, weil die Empfindlichkeit der Kaninchen nicht genauer bestimmt worden ist. Es ist daher der ermittelte wahre Wirksamkeitswert des Standardspräparats genauer definiert, als die Empfindlichkeit der Kaninchen, welche nur auf 100 Proz. genau definiert ist. Trotz dieser auf den ersten Blick geradezu trostlosen Ungenauigkeit ergibt aber die Überlegung, daß die auf solche Weise erhaltenen Resultate mindestens sowohl für manche experimentelle als auch für klinische Zwecke hinreichend genau sind, denn man darf nicht vergessen, daß eben die individuelle Empfindlichkeitsschwankung noch um vieles größer ist, als dieser Ungenauigkeit entspricht. Das gewählte Standardpräparat ist also auf diese Weise hinsichtlich seiner Wirksamkeit definiert. Es erscheint aber notwendig, es auch noch durch sonstige Eigenschaften zu charakterisieren. Von der einen von uns ist gemeinsam mit *Wiechowski* (l. c.) die Notwendigkeit betont worden, sich gegenwärtig zu halten, daß die bloße Tatsache der Blutzuckerwirksamkeit keine Gewähr für das tatsächliche Vorhandensein von Inselsubstanz bietet. Nun sind aber bisher charakteristische Reaktionen, die als Identitäts- oder Reinheitsreaktionen angesehen werden könnten, nicht aufgefunden worden. Die l. c. angegebenen Fällungsreaktionen sind nicht ausschließlich für das Insulin charakteristisch und höchstens im Zusammenhalt und unter Berücksichtigung des Darstellungsganges

als solche verwertbar. Vorläufig ist daher für die Charakteristik des Präparats die Angabe des Darstellungsverfahrens notwendig. Schließlich bietet der Grad der relativen Reinheit des Präparats Anhaltspunkte zur Beurteilung, so daß der Wirkungswert des gewählten Standards, seine absolute Größe, gleichzeitig eine kennzeichnende Eigenschaft darstellt. Je kleiner die der Einheit entsprechende Menge des Vergleichspräparats ist, je größer also die relative Reinheit, um so mehr nähert es sich dem reinen Hormon, zu dessen Dosierung man der Ermittlung seines biologischen Wirkungswerts nicht mehr bedürfen wird.

IV.

Wenn man mit Hilfe eines derart definierten Vergleichspräparats die Wertigkeit irgendeines Insulinpräparats oder einer Organfraktion feststellen will, so kann man sich, wie unsere Erfahrungen gelehrt haben, nicht auf den Vergleich an einem Tier beschränken. Wie schon hervorgehoben, ist die individuelle Empfindlichkeit nicht von einer derartigen Konstanz, daß man selbst unter Einhaltung der oben aufgezählten Vorsichtsmaßregeln sich absolut darauf verlassen könnte, daß die Empfindlichkeit nicht um ein Glied der Reihe mit dem Faktor 2 nach oben oder unten seit der letzten Injektion sich geändert haben könnte. Selbst wenn zwischendurch immer wieder einmal das Verhalten der einzelnen Tiere gegenüber der für sie ermittelten Krampfdosis oder besser halben Krampfdosis kontrolliert wird und man keine Änderung festgestellt hat, bleibt immer noch die Möglichkeit, daß gerade an dem Tage, an dem das Präparat injiziert wurde, die Empfindlichkeit sich geändert habe. Also selbst dann, wenn ein Kaninchen durch eine große Anzahl von Injektionen hinsichtlich seiner Empfindlichkeit gekennzeichnet ist, ist es nicht möglich, für eine Bestimmung mit *einem* geeichten Tier auszukommen (wie wir es ursprünglich hofften), an welchem die der Einheit entsprechende Dosis des zu prüfenden Präparats ermittelt wird. Zu der Wirksamkeitsbestimmung eines Präparats sind auch nach unserer Methode mehrere geeichte Tiere nötig, und es kommt immer wieder vor, daß in einer solchen Reihe das eine oder andere Tier ein Resultat liefert, welches dem Verhalten der übrigen Tiere nicht entspricht. Eine Unterstützung bzw. eine Sicherung der Ergebnisse gewinnt man dadurch, daß man den (bei allen geeichten Kaninchen wenigstens einmal ermittelten) Blutzuckerwert der halben krampfmachenden Dosis mit zur Beurteilung der Wirkung heranzieht.

Allerdings erfordert die regelmäßige Inanspruchnahme dieses Hilfsmittels, daß im Verlaufe der Verwendung eines Kaninchens nicht nur die Wirkung der krampfmachenden Dosis, sondern auch die Wirkung der Hälfte der Krampfdosis des Standardpräparats nachkontrolliert wird. Auf diese Weise erfährt man nun an einer Reihe von Kaninchen

jene Menge des zu untersuchenden Präparats, welche der biologischen Einheit des Vergleichspräparats entspricht, oder aber man versieht jedes geeichte Kaninchen mit einem Empfindlichkeitsfaktor, welcher gegeben ist durch den Quotienten: Krampfmachende Dosis des Standardpräparats $\frac{\text{Ist}}{\text{Soll}}$, und multipliziert die bei den einzelnen Tieren gefundene minimale „krampfmachende" Dosis des zu prüfenden Präparats mit diesem Empfindlichkeitsfaktor.

Auf diese Weise muß man Resultate hinsichtlich der Wertigkeit der Präparate erhalten, welche untereinander vollkommen vergleichbar sind, und eine nachträgliche Auswertung der Präparate am Menschen, womöglich einem diabetischen, müßte völlig überflüssig erscheinen, wenn man sicher weiß, daß es sich um eine einheitliche Substanz handelt. Anders allerdings könnte sich die Sache verhalten, wenn die untersuchten Präparate nicht das reine Hormon des Pankreas darstellen, sondern mit unspezifischen „Glukokininen"[1]) vermengt sind, denn dann kann es geschehen, daß die am Kaninchen ermittelten relativen Werte nicht übereinstimmen mit den Werten, welche etwa in der gleichen Weise am Menschen sich ergeben, da die Abstufung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen blutzuckersenkenden Substanzen (Glukokininen) nach Erfahrungen auf anderen Gebieten beim Menschen eine andere sein kann als beim Kaninchen. So könnte es vorkommen, daß ein beim Kaninchen besonders wirksames Glukokinin beim Menschen besonders schwach (im Verhältnis zum Pankreashormon) wirkt, dann muß ein Vergleich beim Menschen zu einem anderen Resultat führen, als der Vergleich am Kaninchen, und könnte sich beim Vergleich am Menschen (zwischen Standard- und dem vorliegendem Präparat) das beim Kaninchen als vollwertig erkannte beim Menschen als minderwertig erweisen. Eine Kontrolle der Auswertungsresultate am Kaninchen durch einen Menschenversuch erscheint also nur dann wünschenswert, wenn der Gang der Darstellung des Präparats nicht von vornherein die Beimengung von Glukokininen ausschließt, sondern im Gegenteil eine solche zuläßt. Die Möglichkeit der Entstehung unspezifischer Glukokinine bei der Verarbeitung des Pankreas ist, wie die eine von uns (l. c.) ausgeführt hat, nicht ausgeschlossen.

V.

Unser Vorgehen stellt sich (unter teilweiser Wiederholung von bereits Gesagtem in allen Einzelheiten beschrieben) folgendermaßen dar: Die ausschließlich männlichen Kaninchen werden nicht unmittelbar nach dem Einkauf, sondern erst nach einiger Zeit, in welcher sie sich

[1]) Der Kürze wegen gesetzt für alle anderen blutzuckersenkenden Substanzen.

an die geänderte Umgebung gewöhnen können, in den Versuch genommen. In dieser Zeit erhalten sie das auch später immer gereichte Futter, Heu und Hafer, sowie Leitungswasser nach Belieben. Das letztere ist sehr hart, stark calciumhaltig. Es werden nur Tiere ausgesucht, welche allem Anschein nach bereits erwachsen sind, also die unter 1800 g ausgeschaltet. Die Tiere sitzen einzeln in Eisenkäfigen auf Torfstreu. Futter- und Wasserschalen sind erhöht angebracht, so daß sie Verunreinigungen mit Exkrementen nicht ausgesetzt sind. Nur zur Vorbereitung für den 16 bis 24 Stunden später folgenden Versuch kommen alle vorgesehenen Tiere in einen gemeinsamen Käfig, ohne Futter und Wasser, in welchem sie auf einmal überblickt werden können. 24 Stunden vor dem Versuch werden die Tiere gewogen und nur dann verwendet, wenn ihr Gewicht gegenüber der vorhergehenden Wägung keinen 10 Proz. übersteigenden Gewichtsverlust zeigt. Ebenso werden sie sonst untersucht hinsichtlich eventueller Indurationen, Abszessen usw. Die zum Versuch ausgesuchten Tiere werden an der Injektionsstelle mit einem Bariumsulfidenthaarungsmittel [Rezept bei *Katsch*[1])] enthaart, wobei peinlich darauf gesehen wird, die Tiere durch das notwendige Wegwaschen des überschüssigen Depilatoriums nicht zu durchnässen bzw. sie nachher gründlich abzutrocknen. Die genaue Entfernung des Depilatoriums ist wegen der Gefahr einer Bariumvergiftung infolge Leckens an den enthaarten Stellen nötig.

Vor der Injektion wird die enthaarte Stelle mit Jodtinktur bepinselt und die Injektion *unter* die Haut und unter Bedachtnahme, stets unter das Platysma und nicht in dasselbe zu injizieren, ausgeführt. Zu jeder Injektion wird eine frisch ausgekochte Kanüle verwendet. Die Injektionsflüssigkeiten sind infolge ihres Kresolgehalts (0,2 Proz.) an sich steril. Nach vollendeter Injektion und Notierung der Zeit werden die Tiere in ihrem gemeinsamen Käfig 7 Stunden lang dauernd beobachtet. Tieren, welche 2 Stunden nach der Injektion keine Krämpfe zeigen oder nicht wenigstens subkonvulsiv sind, wird Blut aus einer Ohrvene zur Zuckerbestimmung entnommen. Wir arbeiten, wie gesagt, nach der Methode *Bang II*. Die Blutentnahme erfolgt durch Anstechen einer Ohrvene mit einer Nadel. Es werden stets drei Blutproben gewogen, von denen die dritte nur zur Entscheidung bei etwa nicht übereinstimmenden Werten dient und daher zunächst unverarbeitet bleibt. Treten Krämpfe ein, so erhalten die Tiere 40 ccm einer 50proz., unter Toluol vorrätig gehaltenen Lösung von Kartoffelzucker (unreine Dextrose) mit der Schlundsonde in den Magen. Die Fütterung mit der Dextroselösung wird eventuell wiederholt. Nur selten ist schließlich

[1]) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 3B, Heft 1, S. 35.

doch die intravenöse Injektion von 10 ccm einer 25proz. Glucoselösung nötig. Nach Ablauf von 7 Stunden kommen die Tiere dann in ihre Einzelkäfige zurück und erhalten wieder Futter und Wasser.

Die erste Injektion, die ein Tier bekommt, ist der errechnete Durchschnittswert der „krampfmachenden Dosis“ des in Verwendung stehenden Testpräparats. Je nach der Wirkung dieser Injektion erfolgt in zehntägigem Abstand unter Voraussetzung dauernden Wohlbefindens des Tieres die Injektion von entweder der Hälfte oder dem Doppelten dieser Dosis, und so werden, je nach dem Ausfall des vorangehenden Versuchs mit dem Faktor 2 auf- oder absteigend, in zehntägigen Intervallen so lange Injektionen vorgenommen, bis die Dosis festgestellt ist, die Krämpfe macht (bzw. den Blutzucker auf das „Krampfniveau“ herabsetzt), deren Hälfte aber den Blutzucker nicht bis zum kritischen Werte erniedrigt. Dann gilt das betreffende Tier zunächst als geeicht und erhält zu seiner Charakteristik in seiner Beschreibung den entsprechenden Empfindlichkeitsfaktor, der sich, wie oben ausgeführt, ergibt als der Quotient aus der notwendigen Testdosis und der bekannten Durchschnittsdosis des Testes. Nur derart vorbereitete Tiere, die also mindestens zwei Injektionen hinter sich haben und meist einmal Krämpfe hatten, werden zu Auswertungen verwendet. Von jedem dieser Tiere wird auf einem besonderen Blatt eine Chronik geführt, in deren Kopf nebst Nummer Farbe und Empfindlichkeitsfaktor angegeben ist. In dieser Chronik wird neben dem Datum jeder Injektion das jedesmalige Gewicht, das injizierte Präparat und die Wirkung auf die Blutzucker-C eingetragen. Ergibt sich im Verlauf der Verwendung des Tieres, daß es bei einem bestimmten Auswertungsversuch ein anderes Resultat liefert als die gleichzeitig zur Auswertung herangezogenen anderen Tiere, so wird nach 10 Tagen eine Kontrolle seiner Empfindlichkeit derart vorgenommen, daß es entweder die früher ermittelte „krampfmachende Dosis“ oder halbe „krampfmachende Dosis“ des Testpräparats injiziert erhält, wobei sich ergibt, ob die Empfindlichkeit abgenommen bzw. zugenommen hat. Für die Wahl der Menge, die in einem gegebenen Falle zur Kontrolle injiziert wird, ist maßgebend, ob beim letzten Versuch sich die Tiere wahrscheinlich über- oder unterempfindlich gegenüber dem Kontrolltier erwiesen haben. Ein Beispiel für die Chronik oder „Geschichte“ des einzelnen Kaninchens folgt.

Zur Auswertung eines Präparats werden mindestens fünf Tiere verwendet. Unter Berücksichtigung des für jedes geeichte Kaninchen ermittelten Empfindlichkeitsfaktors werden den für den Versuch ausgewählten Tieren Mengen injiziert, welche der (aus der Versuchsfragestellung bzw. der Angabe des Herstellers) angenommenen „krampfmachenden“ Dosis und ihrer Hälfte entspricht. Ergibt sich, daß keines

Tabelle IX.

„Geschichte" des Tieres Nr. 277. Kennzeichen: schwarz, braun gesäumt. E. F. = 2.

Datum	Gewicht g	Injiziertes Präparat	Injizierte Dosis pro kg mg	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.
1924				
6. II.	2050	Test 1	0,3	47
11. II.	2070	„ 1	0,6	44
16. II.	1990	„ 1	1,2	31 Kr
23. II.	1970	*θ*	*θ*	83 **)
28. II.	1980	*θ*	*θ*	83 **)
4. III.	1890	*θ*	*θ*	82 **)
10. III.	2050	Test 1	0,9	40 Kr
20. III.	1950	„ 1	0,6	Kr
30. III.	1740	Nr. 187	0,4 × E. F.*)	Kr
8. IV.	1970	Tier zeigt 3 Infiltrate	—	—
18. IV.	2190	Nr. 207	0,2 × E. F.	Kr
30. IV.	2380	„ 195B	0,25 × E. F.	keine Krämpfe
10. V.	2470	„ 218	0,13 × E. F.	54
20. V.	2550	„ 122	0,05 × E. F.	53
3. VI.	2650	„ 227	0,17 × E. F.	45
12. VI.	2740	„ 189/N	0,2 × E. F.	48
24. VI.	2790	„ 235/F	0,05 × E. F.	58
4. VII.	2900	„ 243	2 g Organ × E. F.	41 Kr nach 8 Std.
3. VIII.	2870	Test 1	1,2	35 Kr nach $6^1/_2$ Std.
14. VIII.	3000	„ 1	0,6	48
24. VIII.	2990	Nr. 255II	$^1/_2$ g Organ × E. F.	Kr nach $3^1/_4$ Std.
5. IX.	3140	„ 263	0,2 × E. F.	35
8. X.	3140	„ 273	$^1/_2$ g Organ × E. F.	39 Kr nach 7 Std.
22. X.	3150	Test 1	0,6	49
4. XI.	3310	Nr. 278	0,2 × E. F.	46
16. XI.	3320	„ 49	0,2 × E. F.	verloren gegangen
26. XI.	3150	Test 1	1,2	43
7. XII.	3370	„ 1	1,8	43
17. XII.	3100	„ 1	2,4	34 Kr nach 5 Std.
1925				
11. I.	3010	„ 2	0,4	Kr nach 2 Std.
21. I.	3030	„ 2	0,2	52
1. II.	3240	Nr. 52	0,2 × E. F.	40
10. II.	3080	„ 284	0,1 × E. F.	39
22. II.	3230	„ 53	0,1 × E. F.	80
4. III.	3220	„ 54B	0,8 × E. F.	91
15. III.	3320	Test 2	0,2	57
25. III.	3170	Nr. 298	$^1/_2$ g Organ × E. F.	33
5. IV.	3330	„ 295	0,025 × E. F.	58
17. IV.	3220	Insulin *Tetewop*	1 Einheit × E. F.	54
29. IV.	3300	Nr. 59	0,05 × E. F.	51
14. V.	3190	Test 2	0,3	37
27. V.	3390	„ 2	0,6	29

*) E. F. = Empfindlichkeitsfaktor des Tieres.
**) Normaler Blutzuckerwert an diesem Tage.

der verwendeten Tiere Krämpfe oder die entsprechend niedrige Blutzuckerkonzentration aufweist, dann wird anderen geeichten Tieren das Doppelte dieser Dosis injiziert, zeigen jedoch alle Krämpfe bzw. das Krampfniveau der Blutzuckerkonzentration, so erhalten andere Tiere

Tabelle X. Auswertung des Präparates

Datum	Tier Nr. 120		Datum	Tier Nr. 22		Datum
	mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.		mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	
1924 3. VI.	0,2	Kr	1924 3. XI.	0,2	Kr	1924 7. VIII.
3. VIII.	0,1	51	13. XI.	0,1	Kr	21. VIII.
14. VIII.	0,2	32	26. XI.	0,05	70	31. VIII.
10. IX.	0,1	Kr	7. XII.	0,05	Kr	2. X.
2. X.	0,05	36	1925 4. I.	0,025	51	22. X.
9. XI.	0,05	Kr	25. I.	0,05	38	1925 7. I.
20. XI.	0,025	55	4. II.	0,1	Kr	16. I.
1925 4. I.	0,05	39	6. III.	0,1	Kr	28. I.
14. I.	0,1	30	14. III.	0,05	Kr	8. II.
6. III.	0,1	40	22. IV.	0,025	24	4. III.
17. IV.	0,1	45				5. IV.
						26. IV.

Präparat Nr. 288. (Siehe dazu da

Datum	mg pro kg des Präparates Nr. 288	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	Datum	mg pro kg des Präparates Nr. 288	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	Datum
1925 31. IV.	0,05	Kr	1925 4. V.	0,00625	52	1925 7. V.

Kontrolle.

Datum	mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	Datum	mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.
1925 17. V.	0,15	Kr	1925 17. V.	0,025	62
29. V.	0,075	46	27. V.	0,075	Kr

ein Viertel dieser Dosis. In Anbetracht dessen, daß die Beobachtung der Tiere 8 Stunden dauert, wird der auf Grund des ersten Ergebnisses etwa notwendige zweite Auswertungsversuch immer erst frühestens am nächsten Tage vorgenommen. Jede geprüfte Dosis wird mindestens zwei Tieren verabreicht, so daß mindestens vier Tiere zu einer Aus-

Nr. 288 gegen Testpräparat 2.

Tier Nr. 156		Datum	Tier Nr. 186		Datum	Tier Nr. 191	
mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.		mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.		mg pro kg des Testpräparates Nr. 2	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.
0,2	Kr	1925 18. III.	0,2	49	1924 14. X.	0,2	Kr
0,1	22	29. III.	0,4	45	26. X.	0,1	54
0,05	40	15. IV.	0,4	40	1925 4. I.	0,1	46
0,1	31	26. IV.	0,6	Kr	14. I.	0,2	55
0,2	Kr				25. I.	0,4	Kr
0,1	59				6. III.	0,4	33
0,2	50				29. IV.	0,3	45
0,2	56						
0,4	30						
0,4	40						
0,4	30						
0,3	37						

beiliegende Injektionsprotokoll.)

mg pro kg des Präparates Nr. 288	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	Datum	mg pro kg des Präparates Nr. 288	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.	Datum	mg pro kg des Präparates Nr. 288	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. nach 2 Std.
0,1	34	1925 7. V.	0,1	27 (Kr)	1925 7. V.	0,1	37

Zusammenfassung.

mg Präparat		mg Test		mg Präparat		mg Test
0,05	=	0,15	oder	0,1	=	0,3
0,00625	>	0,025	„	0,1	>	0,4
0,1	=	0,4				
0,1	=	0,6				
0,1	=	0,4				

Ergebnis: 0,1 mg des Präparates Nr. 288 entspricht 0,4 mg des Testpräparates Nr. 2.

wertung nötig sind. Um Tiere zu sparen, erhält am ersten Tage jedes Tier eine andere Dosis, so daß 2 Tage zur Auswertung nötig sind. Die Sicherheit des Ergebnisses an einem einzelnen Tiere läßt sich im Zweifelsfalle durch die Vornahme einer Kontrollinjektion nach zehntägiger Pause mit der ermittelten halben „krampfmachenden Dosis" des Test-

Tabelle XI.

Injektionsprotokoll für die Auswertung des Präparates Nr. 288.
Die injizierte Lösung enthält in 1 ccm 1 mg.

Datum	Nr. des Tieres	Gewicht des Tieres g	Empfindlichkeitsfaktor	Dosis in mg pro kg	Injizierte mg	Injizierte ccm	Zeit der Injektion	Blutzuckerkonzentration in der 2. Stunde nach Injektion
1925 30. IV.	120	2720	1	0,05 × 1	0,136	0,14	9h	11h 35' Krämpfe
4. V.	22	2010	1/8	0,05 × 1/8	0,01256	0,25 der Verdünnung 1 ad 20	9	52 mg-Proz.
7. V.	156	2750	2	0,05 × 2	0,275	0,28	11 15'	34 mg-Proz.
7. V.	186	2530	2	0,05 × 2	0,253	0,25	11 15	27 mg-Proz. 17h 30' Krämpfe
7. V.	191	2220	2	0,05 × 2	0,222	0,22	11 20	37 mg-Proz.

präparats, deren frühere Wirksamkeit beim Tier bekannt ist, nachprüfen. Der Wirkungswert des untersuchten Präparats ergibt sich aus der Gegenüberstellung der Geschichte des Tieres und der Wirksamkeit der ihm injizierten Dosis des betreffenden Präparats, wobei man die der Einheitsmenge des Testpräparats äquivalente Menge des untersuchten Präparats erfährt. Wir geben als Beispiel ein ausführliches Protokoll der Auswertung eines Präparats in Tabelle X.

Außerdem führen wir ein separates Injektionsprotokoll, in welchem neben Nummer und Gewicht des Tieres insbesondere sein Empfindlichkeitsfaktor angeführt und die auf Grund dieses Empfindlichkeitsfaktors zu injizierende Menge pro Kilogramm und in toto nebst dem Zeitpunkt und dem Ergebnis der Injektion angeführt sind. Auch für die Art dieser Injektionsprotokolle geben wir ein Beispiel in Tabelle XI.

Wir halten uns an die Originalvorschrift der Methode *Bang II* (Zeit der Dampfeinleitung bei uns allerdings 5 Minuten). Nur ein technisches Detail sei hervorgehoben: Wir bedienen uns zur Abmessung des Bijodats einer automatischen Überlaufpipette von etwa 2 ccm Inhalt, ähnlich der bei *Beckurts*[1]) abgebildeten, auf deren genau ausgewogenes Volumen die Kon-

[1]) *Beckurts*, Die Maßanalyse.

zentration des Bijodats derart eingestellt wird, daß eine Füllung genau 2 ccm n/100 Bijodat entspricht. Die Verwendung dieses Instruments hat sich als sehr zeitsparend und die Genauigkeit fördernd erwiesen. Zur Titration verwenden wir, wie schon gesagt, n/200 Thiosulfatlösung.

Bei den ungemein zahlreichen Auswertungen, welche im Verlauf unserer Untersuchung vorgenommen werden mußten, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, für die oben beispielsweise angeführten Protokolle und Zusammenfassungen entsprechende Vordrucke anfertigen zu lassen, ein Vorgehen, welches das Arbeiten namentlich auch für die Kontrolle eines Betriebes sehr erleichtert, die Übersicht und damit die Zuverlässigkeit fördert. Aus dem in dem obigen Beispiel demonstrierten Endergebnis einer Titration kann die Zuverlässigkeit der einzelnen Ermittlungen ohne weiteres abgelesen werden. Zeigen die verwendeten Tiere nicht alle die gleiche Wirksamkeit des untersuchten Präparates an, so kann man sich manchmal, wenn die Differenzen groß sind, auch nicht mit der 10 Tage später vorgenommenen Kontrolleichung der Tiere begnügen, sondern es ist dann nötig, für dasselbe Präparat noch einige andere Tiere zu verwenden. Als Endergebnis gilt dann die Wirksamkeit, welche die Mehrzahl der Tiere anzeigte.

Für präparative Zwecke bzw. beim Studium der Wirksamkeit homologer Fraktionen des Pankreas, an denen die Bedeutung bestimmter Eingriffe studiert werden sollte, gingen wir mit Vorteil von der Auswertung mittels eines Testpräparats an geeichten Tieren insofern ab, als wir die quoad Wirksamkeit zu vergleichenden Präparate oder Fraktionen, natürlich in zehntägigen Abständen, an *einem und demselben* Tiere auf ihre Blutzuckerwirksamkeit prüften. Man kommt hierbei (natürlich unter Opferung von Zeit) mit weniger Tieren, die außerdem nicht geeicht sein müssen, aus. Selbst wenn man die Möglichkeit einer Änderung der individuellen Empfindlichkeit berücksichtigt, erscheint der Vergleich an einem und demselben Tiere viel sicherer als die Auswertung gegenüber einem dritten, dem Vergleichspräparat an mehreren Tieren.

Als Beispiel, wie genau das Ergebnis einer solchen Prüfung ausfallen kann, geben wir die in Tabelle XII zusammengestellten Werte aus dem Versuch 255. An einem und demselben Tiere wurde die Wirksamkeit zweier Teile eines einheitlichen Pankreasmaterials miteinander verglichen, von denen der eine bei saurer Reaktion, der andere bei neutraler Reaktion verarbeitet worden war.

Tabelle XII. Vergleich zweier homologer Fraktionen aus Versuch Nr. 255 an einem und demselben Tier.

Tier Nr.	Blutzuckerkonzentration in mg-Proz. 2 Std. nach Injektion gleicher Dosen	
	von Fraktion 1	von Fraktion 2
85	48	44
59	37	36
89	44	38

VI.

Die Grundlage der beschriebenen Methode ist die Konstanz der individuellen Insulinempfindlichkeit der Kaninchen.

Da jedoch diese Konstanz keine absolute ist, bleibt trotz allen methodischen Fortschritten und Kautelen auch heute noch die Genauigkeit der Insulinauswertung recht unbefriedigend. Trotzdem dürfte wohl auch in Zukunft das Kaninchen als das relativ geeignetste Auswertungstier weiter verwendet werden. Man muß sich daher fragen, ob nicht geeignete Maßnahmen die individuelle Empfindlichkeit der Kaninchen konstanter als bisher gestalten könnten.

In dieser Beziehung wäre in erster Linie an die Abhängigkeit der Insulinwirkung von der Art der Zufuhr zu denken. Ideal wäre natürlich die intravenöse Injektion, welche die Verschiedenheit der Resorptionsgeschwindigkeit, von der die Wirkung zweifellos mit abhängt, ausschaltet. Leider braucht man die zugänglichen Venen zur Blutentnahme. so daß man von der intravenösen Injektion Abstand nehmen muß. Häufig wiederholte Herzpunktionen, welche die Blutentnahme aus den Venen ersetzen könnten, halten wir nicht für vorteilhaft. Auch der wahrscheinlich steilere Verlauf der Blutzuckerkurve nach der intravenösen Insulininjektion ist insofern bedenklich, als man dabei leichter Gefahr läuft, das Minimum zu verpassen. Die subkutane Injektion ist also wohl noch immer die Methode der Wahl. Ob nicht die intraperitoneale Injektion in Betracht zu ziehen wäre, haben wir experimentell am Kaninchen noch nicht studiert. Doch machen es unsere Versuche an Mäusen nicht sehr wahrscheinlich, daß durch sie die Schwankungen der Empfindlichkeit in entscheidendem Maße verringert werden können.

Eine zweite wichtige, die Empfindlichkeitskonstanz betreffende Frage ist die, ob die individuelle Empfindlichkeit der Tiere jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist. Von dem Verhalten der Frösche gegenüber den Digitalisstoffen her ist es bekannt, daß solche jahreszeitlichen Empfindlichkeitsschwankungen vorkommen. Man hat diese Empfindlichkeitsänderung der Frösche meist damit in Zusammenhang gebracht, daß diese Tiere eine lange Winterruhe ohne Nahrungsaufnahme durchmachen, innerhalb welcher naturgemäß ihr ganzer Stoffwechsel verändert sein muß. Aber es hat sich entgegen den ursprünglichen Annahmen gezeigt[1]), daß solche Empfindlichkeitsschwankungen auch während der Wintermonate vorkommen und daß sie bei diesen Tieren meist erheblicher sind als die auch bei Fröschen bestehenden individuellen Schwankungen. Es ist daher nicht aus-

---

[1]) Wie *E. Großmann* (Der Digitalismodulus, Arch. f. exp. Pharm. u. Path.) aus unserem Institute publizieren wird.

geschlossen, daß auch jahreszeitliche Empfindlichkeitsschwankungen bei Kaninchen vorkommen, und daß bis zu einem gewissen Grade durch sie die individuelle Konstanz der Empfindlichkeit beeinträchtigt wird. In Anbetracht der noch immer bestehenden Ungenauigkeit der Auswertung hält es schwer, solche jahreszeitliche Beeinflussungen der individuellen Empfindlichkeit anzunehmen oder auszuschließen. Eine Durchsicht unseres Materials in dieser Hinsicht führte zu keinem bindenden Schluß. Immerhin lassen aber einige unserer Erfahrungen das Vorkommen solcher jahreszeitlichen Empfindlichkeitsschwankungen nicht unwahrscheinlich erscheinen. Es müßten ad hoc angestellte Experimente der Entscheidung dieser Frage an einem viel größeren Tiermaterial als es uns zur Verfügung steht, gewidmet werden. Wir möchten auf diesen Punkt hier verwiesen haben, der naturgemäß wie alle Empfindlichkeitsfragen nicht nur das Insulin betrifft, sondern eine allgemeine biologische Bedeutung hat.

VII.

Die auf die geschilderte Weise bestimmten Wertigkeiten sind in biologischen Einheiten ausgedrückt, jedoch zum Unterschiede von dem, was bisher veröffentlicht worden ist, nicht in absoluten biologischen Einheiten, sondern in biologischen Einheiten, bezogen auf das von uns verwendete Standardpräparat, dessen reeller Wert wie oben ausgeführt, ermittelt worden ist. Wir nehmen aber nicht ein Drittel der für ein 2-kg-Tier, also die für $^2/_3$ kg nötige Menge als diejenige an, welche einer Einheit entsprechen soll, sondern die, welche für 1 kg Tier injiziert werden muß, um den Krampfwert der Blutzucker-C zu bewirken. Zweifellos ist nun die Art der Auswertung bzw. die Wahl dessen, was als Einheit bezeichnet wird, durchaus nicht bei allen im Handel befindlichen Insulinen identisch. Soweit wir die Handelsinsuline mit unserem Präparat verglichen haben, ergaben sich Differenzen insofern, als bezogen auf unser Standardpräparat zwar eine ganze Reihe der Deklaration (1 ccm = 20 Einheiten) entsprach, andere aber weniger und eins bedeutend mehr Wirksamkeit enthielten. Als Extreme fanden wir weniger als ein Viertel und mindestens das Doppelte des deklarierten Wertes. Es wird also augenscheinlich mit verschiedenen Einheiten gearbeitet (bzw. wäre es auch möglich, daß es sich um Abweichungen einzelner Darstellungschargen handelt — wir haben von keinem der fremden Präparate mehr als eine Charge untersucht —, die infolge mangelhafter Auswertungsmethode der Aufmerksamkeit der Hersteller entgangen sein könnten). Es wäre sehr wünschenswert, wenn wenigstens für die einzelnen Staatsgebiete, wenn schon nicht international, ein Standardpräparat geschaffen würde, mittels dessen

unter Berücksichtigung der von uns ausgesprochenen Grundsätze alle Insulinpräparate eingestellt werden.

Die Ärzteschaft ist nur zu bereit, in einer schwächeren Wirkung eines Präparates ein Zeichen qualitativer Minderwertigkeit zu erblicken, ohne zu bedenken, daß es ganz im Belieben des Herstellers steht, das Präparat konzentriert oder weniger konzentriert abzugeben. So kann es vorkommen, daß ein Abweichen von der gewählten oder allgemein beschlossenen Definition der Einheit Täuschungen hinsichtlich der Güte der verschiedenen Präparate hervorrufen kann. Man wird aber zugeben müssen, daß in bezug auf Einstellung der Präparate und Wahl der Einheit gegenwärtig eine kaum zu überbietende Verwirrung herrscht. Es war unserer Meinung nach ganz überflüssig, die ursprüngliche Torontoeinheit zu unterteilen und zur „klinischen Einheit" überzugehen, da in praxi wohl nur ganz selten Bruchteile einer Torontoeinheit angewendet werden[1]). Dies war aber der erste Schritt zu einer Anarchie, die sehr rasch eine Kopenhagener, französische, neue dänische usw. Einheit aufkommen ließ und bald auch dazu führte, daß so und so viele Fabriken zwar nach „Einheiten" deklarierten, aber im Untertitel angaben, daß ihre neue Einheit um x Proz. stärker sei als die frühere. Es ist erklärlich, daß, sobald erst einmal ein Hersteller damit anfing, sein Präparat deklarationswidrig zu verstärken, alle anderen gezwungen waren, sich dem anzupassen, da ja, wie schon gesagt, der Arzt sehr dazu neigt, das Präparat als das *qualitativ* bessere anzusehen, von dem er mit weniger „Einheiten" eine bestimmte Wirkung erreicht, während es sich doch bei dieser Art der Wertung entweder um eine Selbsttäuschung oder höchstens um die von der Qualität doch ganz unabhängige Preisfrage handelt. Dabei trägt ja kaum eine dieser Definitionen etwas zur Verbesserung der Auswertungsmethode bei — nur eine solche Verbesserung aber sollte die Rechtfertigung für eine Änderung des Maßsystems abgeben dürfen. Eine derartige Verwirrung erschwert erstens den Fortschritt auf dem an sich schon hinreichend schweren Gebiete der Insulinauswertung und ist zweitens auch sehr geeignet, die biologische Auswertung überhaupt in Mißkredit zu bringen, was angesichts des oft kaum begreiflichen Widerstandes, der ihrer allgemeinen Einbürgerung aus den Kreisen der praktischen Ärzte entgegengebracht wird, sehr zu bedauern ist. Es ist also dringend zu fordern, daß nun, wo die Erfahrungen über Insulinauswertung doch schon eine Beurteilung zulassen, auf diesem Gebiete endlich klare und einheitliche Verhältnisse geschaffen werden.

---

[1]) Im Gegenteil, spätere Erfahrungen haben ergeben, daß von den Praktikern sogar konzentriertere Präparate als die handelsüblichen vorgezogen werden, wobei dann die Torontoeinheit erst recht ausreichend wäre.

Für die Übertragung der Ergebnisse der Auswertung auf den Menschen wird man wohl in allen Fällen auch damit rechnen müssen, daß auch beim Menschen individuelle Empfindlichkeitsunterschiede bestehen werden, und daß vielleicht auch der individuelle Charakter des vorliegenden Krankheitsfalles hier eine Rolle spielt. Die bereits gar nicht mehr so selten zur Beobachtung gelangten insulinrefraktären Diabetesfälle deuten, zumindest als Extreme, darauf hin, daß individuelle Empfindlichkeitsunterschiede auch beim Menschen bestehen. Sollten auch noch jahreszeitliche Empfindlichkeitsschwankungen beim Tiere einwandfrei festgestellt werden, so dürfte auch das Vorkommen solcher nicht ohne weiteres für den Menschen in Abrede gestellt werden. Denn er dürfte hinsichtlich seines allgemeinen Verhaltens zu Giften unter den Säugern wohl keine Ausnahme machen, dahingehend, daß für ihn die für alle geltenden Empfindlichkeitsschwankungen der verschiedenen Art nicht in Betracht kämen[1]).

VIII.

Die so exzessiven Unterschiede der individuellen Insulinempfindlichkeit, welche uns zu der besprochenen Auswertungsmethode geführt haben, sind eine Tatsache, welche in mehrfacher Beziehung auch für die Beurteilung des physiologischen Geschehens bzw. für die Beurteilung der normalen Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels und auch der Bedeutung des Inselapparats für den Diabetes mellitus von Wichtigkeit ist. Wir haben es uns angelegen sein lassen, die Gründe für die merkwürdige Tatsache aufzufinden bzw. eine Abhängigkeit der Empfindlichkeitsschwankung von anderen Eigenschaften der Tiere, zumindest einen Parallelismus mit anderen individuellen Eigenschaften aufzufinden, haben aber in dieser Beziehung keinen Erfolg gehabt. Es liegt auf der Hand, daß im Falle des Insulins so hochgradige Variationen der Empfindlichkeit bestehen, wie es bisher unseres Wissens von kaum einem anderen Stoff mitgeteilt worden ist. Allerdings ist der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Giften bisher nicht allzuoft Aufmerksamkeit geschenkt worden und wiewohl man sie supponiert bzw. von ihr in der allgemeinen Pharmakologie als von einem jener Faktoren, die die Wirkung beherrschen, spricht, wird sie selten in genügender Weise bei Toxizitätsbestimmungen berücksichtigt und hat erst in der letzten Zeit infolge der Einführung der biologischen Wertbestimmungen die Aufmerksamkeit mehr auf sich gelenkt. Nichtsdestoweniger würden nur annähernd so große Empfindlichkeitsschwankungen wie sie hier

[1]) Ganz zweifellos aber ist es, daß irgendwelche vergleichende Versuche am Tier über die Wirkung bzw. die Beeinflussung der Wirkung des Insulins stets an einem und demselben Tiere ausgeführt werden müssen, dessen Empfindlichkeit vorher festgestellt ist.

vorliegen — man bedenke, daß das 16fache derjenigen Dosis, welche bei einem Tier pro Kilogramm gereicht, Krämpfe macht, bei einem anderen Tier den Blutzucker nur unbedeutend herabsetzten kann —, der Aufmerksamkeit nicht entgangen sein, es wird also wohl hier ein exzeptionelles Verhalten vorliegen, durch das das Insulin sich von anderen Giften in dieser Beziehung deutlich unterscheidet[1]). Wie gesagt, sind Beziehungen anderer Funktionen zu der individuellen Insulinempfindlichkeit nicht aufgefunden worden. Insbesondere haben sich keine klaren Beziehungen zwischen der Insulinempfindlichkeit und dem Nebennierensystem, soweit solche bisher geprüft wurden, feststellen lassen. Ob die Adrenalinempfindlichkeit (gemessen an der Hyperglykämie) zu der Insulinempfindlichkeit in einem individuellen Verhältnis steht, ist noch nicht nach allen Seiten hin durchuntersucht, es macht aber nach einigen orientierenden Versuchen durchaus den Eindruck, als ob solche Beziehungen nicht beständen. Beständen sie, so müßte man gleiche enorme Empfindlichkeitsschwankungen dem Adrenalin gegenüber postulieren. Diese bestehen zweifellos nicht entfernt in solchem Ausmaße[2]). Sicher ist, daß sich Unterschiede gegenüber den Folgen der Adrenalininstillation ins Auge bei extrem insulinempfindlichen und unempfindlichen Kaninchen nicht haben feststellen lassen. Von Wichtigkeit ist es ferner, hervorzuheben, daß wir keine Beziehungen der Höhe des normalen Hungerblutzuckerwertes zu der Insulinempfindlichkeit fanden, denn hohe und niedrige normale Hungerwerte fanden sich sowohl bei den unterempfindlichen als bei den überempfindlichen Tieren. Immerhin müssen diese Versuche noch fortgesetzt werden und auch in morphologischer Beziehung sowohl Nebenniere als Pankreas verglichen werden bei in ihrer Empfindlichkeit weit auseinander liegenden Individuen. Leider ist die so wichtige Untersuchung über den Insulingehalt des Pankreas extrem auseinander liegender Kaninchen nicht nur deshalb schwierig, weil der Insulingehalt wohl recht gering ist, sondern auch deshalb, weil es nicht leicht gelingen dürfte, mit Sicherheit alles im Mesenterium ziemlich weit verstreute Pankreas zur Untersuchung zu bekommen. Wie erwähnt, ist die individuelle Empfindlich-

[1]) Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß Versuche am isolierten Froschherzen, das Muscarin biologisch auszuwerten, sowohl in den Händen anderer als auch bei Versuchen in unserem Institut sehr erhebliche Individualschwankungen der Empfindlichkeit ergeben haben, die aber hier nicht in Vergleich gezogen werden, ebenso wie diejenige, die die eine von uns (Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **106**, **1**, 1925) mit Acetylcholin am Froschherzen beobachtet hat, weil es sich in beiden Fällen um isolierte Organe handelt und bei Versuchen mit solchen nicht lediglich die Individualität des Stammtieres für das Verhalten des Organpräparates verantwortlich gemacht werden kann.

[2]) *Hildebrand*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **88**, 80, 1920.

keit im wesentlichen bloß im Rahmen einer geometrischen Dosenreihe mit dem Faktor 2 konstant und unterliegt ziemlich leicht pathologischen Einflüssen, welche den Gesamtorganismus treffen. Immerhin sind die Schwankungen der Empfindlichkeit des einzelnen Individuums so sehr viel kleiner als die Verschiedenheit der Empfindlichkeit verschiedener Tiere, daß man wohl für die Insulinempfindlichkeit den Rang eines konstitutionellen Faktors vermuten kann. Es fragt sich daher, ob wir es hier mit einer vererbbaren Eigenschaft zu tun haben, eine Frage, deren Entscheidung wir erst in Angriff genommen haben.

Da wir wohl annehmen dürfen, daß sich die Tiere gegen ihr eigenes Insulin nicht anders verhalten werden, als gegen das injizierte, und da außerdem bei allen Tieren annähernd der gleiche normale Hungerblutzuckerwert anzutreffen ist, läßt sich vermuten, daß die überempfindlichen Tiere wenig, die unterempfindlichen viel Insulin produzieren. Gerade mit Rücksicht hierauf wäre die Bestimmung des Insulingehalts des Pankreas einzelner Tiere in hohem Grade wünschenswert. Es ist wohl anzunehmen, daß sich die Empfindlichkeitsunterschiede dem Insulin gegenüber nicht bloß auf das Kaninchen und, wie oben mitgeteilt, die weiße Maus beschränken, sondern daß mit großen Empfindlichkeitsunterschieden auch beim Menschen zu rechnen sein wird. Wenn das der Fall ist, und wenn in der Tat der Schluß vom injizierten auf das selbst produzierte Insulin zulässig ist, dann ist bei den insulinunter- und minderempfindlichen eine diabetische Konstitution gegeben, die von dem Verhalten des Pankreas ganz unabhängig ist. Diese diabetische Konstitution würde sich in einem abnorm hohen Insulinbedarf äußern und könnte zu einem manifesten Diabetes führen bei einem Zustand des Pankreas, welcher als durchaus normal angesehen werden muß. Die bereits seit der ersten diesbezüglichen Mitteilung von *Jaksch* und später von *Falta* mehrfach beschriebenen, gegen Insulin fast völlig refraktären Diabetesfälle stellen ein Extrem dar, welches um so interessanter ist, als es für den Menschen schlagend beweist, was aus den von uns mitgeteilten Erfahrungen zu schließen war, daß für die Insulinwirkung eine Reihe von Bedingungen gegeben sein müssen, daß das Verhalten des übrigen Organismus, allerdings in einer Weise, die gegenwärtig noch nicht zu überblicken ist, maßgebend für die Wirksamkeit des Insulins ist. Diese Bedingungen für die Insulinwirkung (Koeffizienten im Sinne *E. H. Herings*) aufzufinden, muß als eine der wichtigsten Aufgaben der Erforschung der Physiologie des Insulins angesehen werden. Es ist naheliegend, daß andere Hormone hier maßgebend eingreifen, ob das Adrenalin hierbei die entscheidende Rolle spielt, ist zumindest noch nicht sicher, wenn auch *Shimidzu*[1]) das korre-

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **103**, 52, 1924.

lative Eingreifen des Adrenalins nach einer Insulininjektion nachgewiesen hat.

Der Erforschung dieser und anderer mit dem Insulin zusammenhängender Probleme steht noch immer der Umstand im Wege, daß die Meßmethoden für Insulin, trotz Aufwandes vieler Arbeit zahlreicher Forscher, sehr ungenau sind. Die mitgeteilten Ergebnisse lassen die hier sehr engen Grenzen der biologischen Auswertbarkeit und die einzige Möglichkeit, sie zu erweitern bzw. zu genaueren Resultaten zu kommen, scharf hervortreten. Nur wenn es gelingt, die individuelle Insulinempfindlichkeit konstanter zu gestalten, kann man hoffen, zu einer genaueren biologischen Auswertung zu gelangen. Aber auch dann wird sie mit einem Fehler von mindestens 50 Proz. behaftet bleiben, so daß ein wesentlicher Fortschritt auf allen Einzelgebieten, die genauere Insulinmessungen erfordern, nur von der Auffindung anderer Methoden als der der Messung der Minderung der Blutzucker-C erhofft werden kann.

Untersuchungen zum Verteilungsproblem.

I. Mitteilung: Organische Bleiverbindungen.

(Kurze Mitteilung.)

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut Göttingen.)

(Eingegangen am 16. Juni 1925.)

Die nachstehend mitzuteilenden beiden Analysenreihen eröffnen eine Untersuchungsfolge, die ermitteln soll, ob es gelingt, den Weg organischer Verbindungen und Gruppen im Organismus an mit ihnen verbundenen, leicht nachzuweisenden Elementen zu verfolgen. Es wurde zunächst gefragt, ob die Verteilung metallorganischer Verbindungen im Organismus lediglich durch das Metall bestimmt wird oder ob — bei gleichartigem Lösungsverhalten der Verbindungen — die organischen Radikale von lenkendem Einfluß sind. Gewählt wurden zunächst zwei organische Bleiverbindungen, das Triäthylbleichlorid und das Triphenylbleichlorid, die entsprechenden Verbindungen anderer Metalle sollen folgen.

Versuch 1. Einem mittelgroßen Kaninchen wurden im Laufe von 15 Tagen 0,096 g Triäthylbleichlorid, entsprechend 60 mg Blei, in täglichen Dosen von 4 bis steigend auf 12 mg, gelöst in neutraler Ringerlösung unter die Rückenhaut injiziert. Es wurde noch 3 Tage gewartet, das Tier durch Ausbluten getötet, mit Ringer nachgespült, Blut, Gesamtharn der Versuchszeit sowie die in der Tabelle I aufgeführten Organe weiter verarbeitet. Die organische Substanz wurde durch $KClO_3$ und HCl zerstört, das Blei als Sulfid gefällt, in Sulfat übergeführt, geglüht und gewogen.

Versuch 2. Einem mittelgroßen Kaninchen wurden im Laufe von 16 Tagen 0,14 g Triphenylbleichlorid, entsprechend 61,2 mg Blei, in Dosen von 10 bis 20 mg, in Olivenöl suspendiert unter die Rückenhaut gebracht. Weitere Verarbeitung wie in Versuch 1, nur wurde die organische Substanz mit Salpetersäure zerstört. Die etwas verschiedene Applizierung ist ohne Bedeutung, da in beiden Fällen ein Depot der Substanzen in der Subcutis gebildet wurde.

Tabelle 1.

	Triäthylblei mg Pb	Triphenylblei mg Pb
Hautdepot	27,3	35,5
Blut	6,8	0,0
Hirn und Rückenmark	3,4	7,5
Lunge	0,0	0,0
Magendarm	5,5	1,7
Leber	2,0	0,7
Niere	0,0	0,0
Harn	11,5	13,6
	56,5	59,0

Es zeigt sich also eine deutlich verschiedene Verteilung, besonders auffällig ist der Unterschied im Blute und Zentralnervensystem. Die Vergiftungserscheinungen, zumal die Abmagerung, waren an dem Äthylbleitier viel ausgeprägter als an dem anderen.

Adsorptionskohle als Kolloiddiagnostikum.

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut Göttingen.)

(Eingegangen am 16. Juni 1925.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

Die zumeist in der Patentliteratur niedergelegten Verfahren zur Herstellung einer guten Adsorptionskohle zielen — wie *Freundlich*[1]) hervorhebt — neben der Fernhaltung oder Beseitigung von Teerstoffen vor allem auf möglichste Erhaltung der Struktur des organisierten Ausgangsmaterials, als Vorbedingung einer großen Adsorptionsfähigkeit. Von dieser technischen Erfahrung aus ergab sich das Problem, ob es nicht umgekehrt auch möglich sei, von der Adsorptionsleistung auf die Struktur des verkohlten Materials zu schließen.

Träger der Adsorption ist der elementare, amorphe Kohlenstoff, nach den Untersuchungen von *H. Herbst*[2]) adsorbiert eine Kohle um so besser, je höher ihr Prozentgehalt an Kohlenstoff, je niedriger der an Wasserstoff ist, und zwar steigt die Adsorption stärker als der Kohlenstoffgehalt, ein Ausdruck der hemmenden Wirkung der Kohlenwasserstoffe. Die ganze Adsorptionsfähigkeit kann aber nur zur Auswirkung kommen, wenn die gesamte innere Oberfläche der Kohle dem Adsorptiv zugänglich ist. Bei größeren Molekülen oder Teilchen spielt daher für die tatsächliche Adsorption diese Zugänglichkeit — von *Herbst* „Ultraporosität" genannt — eine beherrschende Rolle. Sie ist es auch, deren Verschiedenheit bei den verschiedenen, nach dem gleichen Verfahren hergestellten Kohlen als Folge der Ausgangsstruktur anzusehen wäre, auf sie zielte also die oben formulierte Problemstellung ab.

Die Untersuchung hat nun in der Tat ergeben, daß nicht nur die Struktur im morphologischen Sinne, sondern auch der Kolloid-

[1]) Kapillarchemie, 2. Aufl., S. 179.
[2]) Diese Zeitschr. **115**, 204.

zustand in vitalen Flüssigkeiten, wie Blut und Serum, die Ultraporosität der Kohle, gemessen an der Adsorption eines großen Moleküls (Methylenblau), wesentlich bedingt. Wenn in einem kolloidalen System die Teilchengröße zunimmt, ihre Zahl sich vermindert und diese Veränderung sich der entstandenen Kohle mitteilt, so muß die Ultraporosität steigen, die Größe der inneren Oberfläche im ganzen sinken. demgemäß muß die Adsorption eines Stoffes wie Methylenblau zuerst zu-, dann abnehmen. Werden an ein und derselben derartigen Reihe von Kohlen verschieden große Adsorptive verwendet, so wird ein jedes sein Adsorptionsmaximum haben, das sich als Differenzwirkung jener beiden Momente ergibt. In dieser Richtung ist die Untersuchung noch auszudehnen, die bisherigen Ergebnisse beziehen sich — mit wenigen Ausnahmen — nur auf das Methylenblau.

Methodik.

Am geeignetsten zur Erzielung guter Übereinstimmung in Doppelbestimmungen hat sich folgendes Verfahren herausgestellt:

Das Material — Gewebe oder Flüssigkeit — wird in einen großen Überschuß von Pottasche eingetragen und im Porzellantiegel bei kleiner Flamme zunächst einmal bis zum Verschwinden der brenzlichen Dämpfe verkohlt. Es muß so viel Pottasche sein, daß die Flüssigkeit — 10 bis 20 ccm — darin versickert und ein körniger Brei, keine Lösung entsteht. Nach dem Erkalten wird die Masse aus Kohle und Pottasche in der Reibschale zerrieben und im Tiegel abermals erhitzt, bis auch beim Umrühren der Masse keine Verbrennungsgase mehr wahrnehmbar sind. Die noch heiße Masse wird in ein großes Becherglas destillierten Wassers geschüttet, nach Absetzen der Kohle wird über 24 Stunden unter etwa sechsmaligem Wechsel des Wassers gewässert, das erwies sich als sicher ausreichend. Bekanntlich ist es nicht möglich, die Kohle ganz elektrolytfrei zu bekommen, aber bei dem gewaltigen Überwiegen des Kaliumcarbonats über die Elektrolyte des Verkohlungsmaterials treten diese ganz zurück und können keine Unterschiede der Kohlen bedingen. Verschiedentlich angestellte Versuche des Zusatzes von kolloidunwirksamen Elektrolytmengen vor der Verkohlung. von größeren Mengen während und nach ihr bestätigten diese Überlegung. Die Kohlen werden im Hitzschrank getrocknet und im Achatmörser fein zerrieben. Nachträgliche Extraktion mit Äther erwies sich als überflüssig bei diesem Verfahren.

Der Adsorptionsversuch wurde mit sehr kleinen Kohlenmengen angesetzt, um der Methode einen größeren Anwendungsbereich zu verschaffen. er fiel hinreichend scharf aus. Es wurden 20 bis 30 mg Kohle in einem Volumen der Farbstofflösung geschüttelt, das zu je 0,2 ccm auf 1 mg Kohle gewählt wurde. In den ersten Versuchen war eine wässerige Methylenblaulösung $4{,}28 \cdot 10^{-3}$ molar verwendet worden, später durchweg eine m/100 Lösung in m/15 Phosphatpufferlösung von p_H 5,906. Geschüttelt wurde eine halbe Stunde, zentrifugiert und nach Verdünnung von 1 : 100 mit jedesmal neu verdünnter Keillösung im *Authenriet*schen Kolorimeter verglichen. Die Empfindlichkeit der Methode würde durch Verwendung eines Eintauchkolorimeters zu steigern sein, leider stand es mir bisher nicht zur

Verfügung. Zu beachten ist die Behandlung der Glasgefäße, sie dürfen nicht mit Säuren gereinigt, sondern nur mit Wasser ausgespült und im Wärmeschrank getrocknet werden, so daß die bläuliche Anfärbung bestehen bleibt.

Ergebnisse.

Die Zahlen geben die prozentuale Färbungsabnahme.

Meerschweinchen. Die Tiere wurden durch Entbluten getötet, das Blut zum Teil direkt in die Pottasche fließen lassen, zum Teil nach eingetretener Gerinnung darein gebracht und verrührt. Versuche 1 bis 5 sind mit der ungepufferten Farblösung angesetzt, 6 bis 8 mit der gepufferten. Die mit einem Stern bezeichneten Zahlen sind Bestimmungen nach 36stündigem Stehen der Organe in der Kälte.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Blut, ungeronnen	45	31	30	20	20	24	—	—
„ geronnen	35	21	13	9,5	15	12	13	13
Lunge	37	21	12	15	14	17	16	—
Leber	15	8	13	28	21	17,5 16*	16	—
Niere	28	20	13	11	13	10,5	18	—
Muskel	17	6,5	11	8,5	11	19 17*	22	—

Die Werte der ersten Versuche sind entschieden zu hoch infolge der noch nicht ganz entwickelten Technik, sie sind hier aufgeführt, weil sie den für die Beurteilung der Methode wichtigsten Befund des Unterschieds von geronnenem und ungeronnenem Blute auch zeigen. Die Blutkohlen von 5 wurden mit gleicher Methodik auch mit Trypanblau, als einem noch größeren Teilchen, 0,0516 g auf 100 ccm, geprüft, beide ergaben die gleiche Entfärbung von 10 Proz. Die Kohlen des geronnenen Blutes von 2, 3 und 4 wurden mit n Essigsäure geschüttelt, Titration mit n/10 NaOH und Mikrobürette ergab die Reihe: 10, 12, 12,5 Proz. auf 0,1 g Kohle und 10 ccm.

Die Werte für die Organkohlen zeigen keine Regelmäßigkeiten von Tier zu Tier, aber die Unterschiede, welche durch das Aufbewahren der Organe auf Eis entstehen, deuten auch auf die Variabilität der Kohlen mit dem Kolloidzustand. Dieser Einfluß der Zeit ergab sich auch in den weiteren Versuchen an Organen, Organeiweißextrakten, Blut und Serum.

Es wäre weiterhin noch festzustellen, ob sich der funktionelle Zustand eines Organs mit der Kohlemethode verfolgen läßt, bis jetzt wurde nur der Unterschied von gereiztem und ungereiztem Froschmuskel untersucht:

Frosch.

Nr.	1	2	3
Ungereizt	15	16	16
Gereizt	22,5	—	24,5
Atonisch	—	13,5	—

Gereizt wurde tetanisch der ganze Schenkel mit Unterbrechungen eine halbe Stunde, 2 entstammt einem Brondgeestversuch nach mehrstündiger Dauer. Der Befund der mit der Reizung wachsenden Ultraporosität stimmt zu den *Embden*schen Vorstellungen von dem Zusammenhang zwischen Erregung und Permeabilität.

Kaninchen. Verfahren wie bei den Meerschweinchen. Das Blut gerinnt langsamer und scheidet alsbald Serum ab.

Nr.	1	2	3	4
Blut, ungeronnen . .	23	27	—	30
„ geronnen . . .	23	25	20	21
Leber	20	28	12	21
Niere	29	13	16	25

Schwein. Niere wurde teils fein zerrieben, teils nur grob zerhackt, von jeder Portion wurde ein Teil mit destilliertem Wasser, ein Teil mit Ringerlösung in reichlichem Überschuß angesetzt und 36 Stunden kalt aufbewahrt. Ein Quantum der fein zerkleinerten Masse wurde sofort verkohlt.

	Fein	Grob
Frisch	26	—
Wasser	21	24
Ringer	21	24

Rind. Leber in gleicher Weise verarbeitet.

	Fein	Grob
Frisch	23	—
Wasser	16,5	16,5
Ringer	17	18

Die Versuche zeigen, zugleich mit der Genauigkeit der Methode, wie variabel die Kohlen mit den Verteilungsänderungen der kolloidalen Ausgangsstoffe sind. Maßgebend ist offenbar der Zustand im Moment der Einbringung in die Pottasche, die gewissermaßen als Fixator dieser Verteilung wirkt. Eine Verkohlung der Materialien allein, mit oder ohne voraufgehende Fixation in Alkohol, ergab keine reproduzierbaren Werte. Nach Eintragen der Organstücke in die Pottasche können sie beliebig lange aufbewahrt werden, ohne daß die Kohlewerte sich ändern.

Die überwiegende Zahl von Versuchen wurde mit Blut und Serum verschiedener Herkunft angestellt. Es wurden, wenn genügend Material zur Verfügung stand, 10 ccm zu der einzelnen Verkohlung genommen, es genügen aber schon 5 ccm Serum für eine Adsorptionsdoppelbestimmung.

Die Zahlen haben die gleiche Bedeutung wie oben, es wurde die m/100 Farbstofflösung in Pufferung verwendet; zwei Zahlen in einer Rubrik bezeichnen Doppelbestimmungen inklusive Verbrennung, die Adsorptionsdoppelversuche wurden nicht gesondert aufgeführt, da nur übereinstimmende aufgenommen wurden.

Hammel.

	Methylenblau	n Essigsäure Proz.
Serum	20	3,3 (0,1 g Kohle/10 ccm)
Serum, 3 Tage dialysiert	33	2,3
Blutkuchen	12	3,6

Rind.

Serum	Serum + Ringer 1 : 2	Serum + Wasser 1 : 2
21	24	24,5

Mensch.

	R. E.	*K. M.*	*E. H.*
Blut, ungeronnen	14	13	14
„ geronnen	16	17	20

	Kk.	*Et.*
Serum	12,5	15
Blutkuchen	15	18

	Mk.	*Er.*	*Ertr.*	*Wr.*	*Kg.*	*Sh.*	*Rp.*
Serum	24 23,5	22 22,5	17	25	21	23	25
Serum/Wasser aa	27	32	19	24,5	24	22	—
„ „ 1:2	—	—	—	20	—	—	—
Serum/Ringer aa	25	—	—	—	21,5	24	—
Serum/ges. NaCl aa	—	32,5	—	—	—	—	—
Serum/25 Proz. NaCl aa	24	—	—	—	29	—	—
Serum + NaCl - Überschuß	—	27	17	—	—	23	24,5

Das Material dieser und der nachfolgend aufgeführten Versuche verdanke ich zum größten Teil der Göttinger medizinischen Klinik und Poliklinik, wofür ich den Herren *Erich Meyer*, *Seyderhelm* und *Meyer-Bisch* herzlich Dank sage.

Es folgen einige erste Vergleichsversuche zweier verschieden großer Adsorptive.

	Methylenblau	Trypanblau
Serum *Kk*.	12,5	10,5
„ *Mk*.	24	17,5
„ *Kn*.	23	13

Es besteht also, wie erwartet, keine Parallelität.

In der nachstehenden Tabelle sind die Serumwerte des klinischen Materials mit diagnostischem Stichwort angegeben, da es überwiegend poliklinisch war, ist es nur zum kleineren Teile als ausgesprochen pathologisch zu bezeichnen.

1	*G. E.*	47 Jahre	Adipositas mit Herzinsuffizienz	17	
2	*R. M.*	32 „	Bigimenie-Extrasystolie	18,5	
3	*L. T.*	39 „	Hypertonie	20	
4	*K. H.*	62 „	Arteriosklerose	23,	23
5	*H. R.*	48 „	Aortensklerose	21	
6	*A. L.*	23 „	Nervositas	28	
7	*K. W.*	32 „	Nephrosklerose	21,5	
8	*A. S.*	45 „	z. B. Cor	16	
9	*W. U.*	47 „	Myodegeneratio, Bronch. chron.	16	
10	*A. J.*	22 „	Myxödem	20,	21
11	*E. H.*	66 „	Arteriosklerose	20	
12	*A. B.*	48 „	Hypertonie	20,5	21
13	*E. S.*	35 „	z. B. Cor	17	
14	*M. S.*	35 „	z. B. Cor	21	
15	*W. R.*	24 „	z. B. Pulmo	25	
16	*E. J.*	68 „	Emphysem, z. B. Cor	22,5	
17	*K. G.*	50 „	Aorta lata	20	
18	*L. R.*	43 „	Arthritis	21	
19	*R. N.*	54 „	Neuropathie	19	
20	*E. E.*	56 „	Adipositas	22	
21	*G. R.*	49 „	Aortensklerose	22	
22	*J. D.*	42 „	Lues	23,5	
23	*M. K.*	25 „	Endocarditis	23	
24	*E. K.*	31 „	Nervositas	12,5	
25	*M. S.*	58 „	Hypertonie	22	
26	*A. E.*	40 „	Lues	15	
27	*M.*	—	z. B. Cor	24	
28	*K. O.*	43 „	Diabetes	15	
			(Serum 24 Stunden gestanden)	20	
29	*K. H.*	23 „	Plethora	22,5	
30	*T. S.*	56 „	Plethora	23	
31	*H. W.*	48 „	Adipositas	25	
32	*H. K.*	56 „	Arteriosklerose	21	
33	*A. K.*	—	Hypertonie	12,5	
34	*N. N.*	—	Gravida	17	
35	*B.*	—	Adipositas	21,	24
36	*H.*	—	Diabetes	23	
			(4 Wochen spätere Entnahme)	24	

Der Mittelwert dieser 36 Bestimmungen beträgt 19,7 Proz.

Die Mannigfaltigkeit der Serumkohlen und die Abhängigkeit von dem Kolloidzustand wird nun noch deutlicher in den nachstehend in Kurvenform wiedergegebenen Versuchsreihen (Abb. 1 bis 13). Es

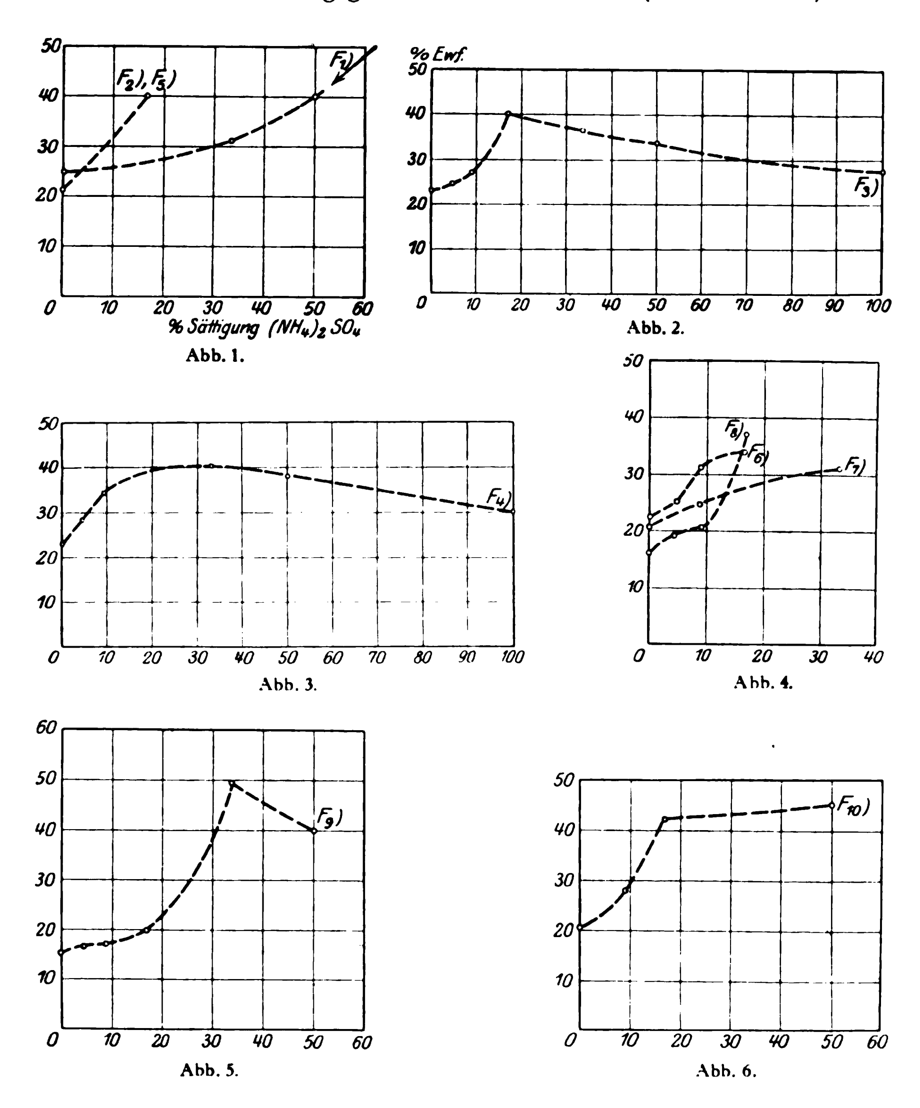


Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3. Abb. 4. Abb. 5. Abb. 6.

wurden je 10 ccm des Serums mit steigenden Mengen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, in den Kurven sind auf der Abszisse die prozentige Sättigung an Ammonsulfat, auf der Ordinate die Entfärbung in Prozenten eingetragen, je nach der Menge des verfügbaren Serums ist die Länge der Kurve ausgefallen. Daß es sich auch hier um die Ammon-

sulfatwirkung auf die Serumkolloide und nicht etwa um eine Elektrolytwirkung auf die Adsorption an der Kohle handelt, dafür spricht der Verlauf der meisten Kurven mit einem deutlichen Maximum, dafür spricht ferner die Mannigfaltigkeit der Kurven, weiter die durch mehrfache Versuche erhärtete Tatsache, daß nachträgliche Behandlung (erneutes Glühen) einer Kohle mit Ammonsulfat ohne Einfluß ist, sowie daß längeres Stehen des ammonsulfathaltigen Serums vor dem Einbringen in Pottasche den Wert verändert, z. B. bei 16proz. Serum in 24 Stunden von 31 auf 47 steigerte.

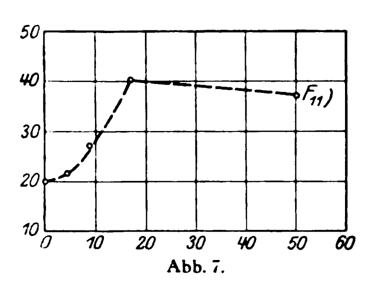


Abb. 7.

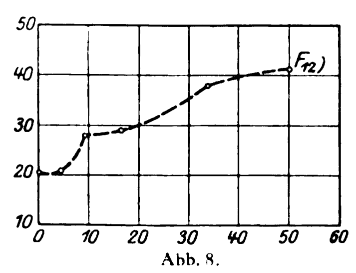


Abb. 8.

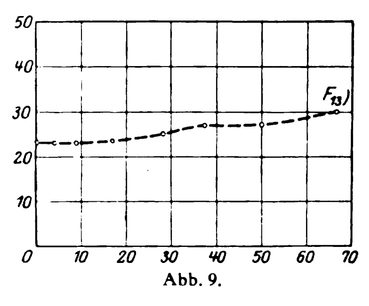


Abb. 9.

Eine Analyse der Kurven unter Beziehung auf bekannte Serumkonstanten ist noch nicht durchführbar, die Frage der diagnostischen Verwertbarkeit der Methode wäre an einem größeren Material zu prüfen. Auffällig sind die Kurven Abb. 9 und 13, bei denen der Anstieg erst bei relativ hoher Ammonsulfatkonzentration bzw. fast gar nicht erfolgt, sie entstammen den beiden Diabetikerseren.

Schließlich sei noch ein Versuch angeführt, der zeigt, wie die Methode auch noch auf andere Probleme Anwendung finden kann. Es wurde eine tryptische Caseinverdauung in der Weise verfolgt, daß in Zeitabständen je 10 ccm entnommen und in der beschriebenen Art auf Adsorptionskohle geprüft wurden.

100 ccm 4proz. Casein + 10 ccm 2proz. Pankreatin Rhenania in Phosphatpuffer, p_H 7.5, 37°.

0 Std.	1/2 Std.	1 1/2 Stdn.	3 Stdn.	6 1/2 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	8 Tage
27	22	20	23	26	27,5	28	24

Die absoluten Mengen der aus je 10 ccm des Verdauungsgemisches entstandenen Kohlen nahmen mit dem Fortgang des Versuchs stark ab, zuletzt mußten 20 ccm verkohlt werden, um den Adsorptionsversuch anstellen zu können. Da der Kohlenstoffgehalt der Volumeneinheit sich ja nicht geändert haben kann, ist hieraus zu schließen, daß die kleineren Abbauprodukte abdestilliert sind, man hat also

wohl die Kohle auf Substanzen kolloidaler Verteilung zu beziehen. Der regelmäßige Verlauf der Kurve mit bald erreichtem Minimum — entsprechend dem Caseinschwund —, langsamem Neuanstieg bis zu einem Maximum und abermaligem Sinken, das als Überwiegen der Abnahme der gesamten Kohleoberfläche gegenüber der Zunahme der Ultraporosität zu deuten wäre, stimmt zu der früher[1]) entwickelten Vorstellung, daß mit dem enzymatischen Prozeß eine Entstehung gröber disperser Substanz verbunden sei. Die Methode der Verkohlung dürfte auch bei anderen enzymatischen Prozessen sowie solchen aus dem Gebiet der Serologie mit Nutzen anwendbar sein.

Werte der Ammonsulfatkohlen.

	10 ccm Serum +	0,5	1	2	4	5	6	10 ccm Ges.	Überschuß $(NH_4)_2SO_4$
F 1, Ser. 31	25	—	—	—	—	31	—	40	—
F 2, „ 32	21	—	—	40	—	—	—	—	—
F 3, „ 4	23 23	24,5	27	40	—	36,5	—	34	28,5
F 4, „ 35	21 24	28	36 33	—	—	40 40	—	38	30
F 5, „ 5	21	—	—	41	—	—	—	—	—
F 6, „ 29	22,5	25	31	34	—	—	—	—	—
F 7, „ 7	22	—	25	—	—	31 47*)	—	—	—
F 8, „ 9	16	18,5	20,5	37	—	—	—	—	—
F 9, „ 28	15	16,5	17	20 20	—	50 48	—	40	—
F 10, „ 10	20 21	—	29	33	—	42 42	—	45	—
F 11, „ 11	20	21	27	40	—	40	—	37	—
F 12, „ 12	20,5 21	21	28	29 29	—	38	—	41	—
F 13, „ 36	23	23	23	23,5	25	—	27	27,5	30**)

*) 24 Stunden gestanden. — **) = 10 ccm Serum + 20 ccm $(NH_4)_2SO_4$.

Die dicht untereinander stehenden Zahlen sind Doppelbestimmungen.

[1]) Diese Zeitschr. **128**, 431; **149**, 269; **153**, 362.

Über tryptische Verdauung bei schwacher Enzymkonzentration. III.

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut Göttingen.)

(Eingegangen am 16. Juni 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In den früheren Mitteilungen[1]) war über Untersuchungen berichtet worden, welche die zeitlichen Veränderungen des Enzyms in quantitativer wie auch qualitativer Richtung sowie die mitbestimmende Wirkung verschiedener Substrate aufzeigten. Die nunmehr mitzuteilenden weiteren Ergebnisse setzen diese Linie fort, zugleich geben sie Einblick in Einzelheiten des Spaltungsvorganges und zeigen, daß bei ausschließlicher Variation der Enzymkonzentration der Spaltungsvorgang qualitativ geändert wird. Daß schon das einfache Altern zwei Enzymlösungen in verschiedener Richtung verändern kann, gemessen an der Wirkung auf verschiedene Substrate, lehrt folgender Versuch:

1 Proz. Pankreatin Rhenania in Phosphatlösung p_H 7,5, zentrifugiert, überstehende Lösung A. Zentrifugat in 100 ccm Phosphat aufgenommen, 24 Stunden gestanden, wieder zentrifugiert, überstehende Lösung B. Verdauungsversuche 10 : 20 ccm von a) 2proz. Casein, b) 2proz. Wittepepton, beides in Phosphat, 37°, van-Slykebestimmung, Wertezunahmen des NH_2-N in mg/100 pro 1 ccm.

	Casein				Wittepepton			
	1/2 Std.	2 Stdn.	24 Stdn.	72 Stdn.	1/2 Std.	2 Stdn.	24 Stdn.	72 Stdn.
Lösung A	17	23	52	68	14	31	46	50
Nach 18 Tagen . .	22	33	62	67	9	21	42	52
Lösung B	5	15	34	51	0	6	19	21
Nach 18 Tagen . .	5	10	33	41	0	7	28	31

[1]) Diese Zeitschr. **128**, 432; **149**, 269, **153**, 362.

Nach dem 18tägigen Stehen hatten sich beide Lösungen wieder stark getrübt, sie waren — vor obigem zweiten Verdauungsversuch — abermals zentrifugiert worden. Die neuerlichen Zentrifugate waren in je 10 ccm Phosphat aufgenommen und mit 20 ccm Wittepepton angesetzt:

	1/2 Std.	2 Stdn.	24 Stdn.	6 Tage
Zentrifugat A	0	0	15	26
Zentrifugat B	0	4	18	34

Aus dem Versuch geht hervor: Lösung A hat sich durch das längere Stehen für Casein verbessert, für Wittepepton verschlechtert, B umgekehrt. Da vor dem zweiten Versuch zentrifugiert war, ist auch an den Fortfall von Hemmungen zu denken, das Bemerkenswerte ist die Verschiedenheit der Veränderung bei A und B. Lösung B, die ja nur den wässerigen Auszug des ersten Zentrifugats von A darstellt, gibt nach dem Stehen ein wirksameres Zentrifugat als die viel stärkere Lösung A. Die Ergebnisse werden verständlich unter der früher entwickelten Vorstellung eines „Enzymablaufs", dessen verschiedene Stufen verschiedenen Stadien der Proteolyse zugeordnet sind. Alle weiter mitzuteilenden Ergebnisse stimmen damit überein.

Die in dem obigen Versuch wie auch schon früher (zweite Mitteilung) angewendete Methode der sukzessiven Zentrifugierung mit Extraktion wurde wiederum zur Behandlung des Problems der Steigerung der Wirksamkeit durch Aufnahme in substrathaltiger Lösung benutzt.

Nach obigem Verfahren gewonnenes viertes Zentrifugat, ausgehend von 100 ccm 1proz. Pankreatinphosphatlösung, wurde in 10 ccm Phosphat aufgeschwemmt, zu 5 ccm auf A 50 ccm 1proz. Caseinphosphatlösung, B 50 ccm Phosphat verteilt, nach 24 Stunden wieder abzentrifugiert, die beiden Zentrifugate in je 50 ccm Phosphat aufgenommen: C und D. Verdauungsversuche 10 : 20 ccm 2proz. Casein bzw. Wittepepton. Bezeichnung wie oben.

	Casein				Wittepepton				
	1/2 Std.	2 Stdn.	18 Stdn.	7 Tage	1/2 Std.	2 Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	5 Tage
A	1	1	17	29	5	5	9	15	18
B	0	0	6	20	0	0	—	7	15
C	2	2	10	21	0	0	—	8	13
D	0	1	14	25	0	0	—	8	15

In einem Versuch mit der Lösung A allein war festgestellt worden, daß die Zunahmen des NH_2-N in den Verdauungsversuchen nicht zum Teil auf ihrem 1proz. Casein beruhten, er ergab — nach dem 24stündigen Stehen über dem Zentrifugat — keine Zunahme in 17 Stunden bei 37°.

Die Proben zeigen eine erheblich größere Wirksamkeit des substrathaltigen Zentrifugatauszuges, zumal gegenüber dem Pepton. Für die Annahme einer wirklichen Zunahme an enzymwirksamer Substanz in

Berührung mit dem Substrat spricht der Vergleich der Ausbeuten aus den zusammengehörigen Proben A + C und B + D, er ergibt beim Casein nach 18 Stunden 27 gegen 20, nach 7 Tagen 50 gegen 45, beim Pepton nach 24 Stunden 23 gegen 15, nach 5 Tagen 31 gegen 30.

Weiteren Aufschluß über den Gang der Spaltung und die Veränderungen des Enzyms bei verschiedenen Substraten und verschiedenen Enzymkonzentrationen gibt eine Untersuchungsreihe, bei der die Proteolyse sowohl an dem NH_2-N wie an dem von Gerbsäure nicht fällbaren N verfolgt wurde. Ausgegangen wurde von ein und derselben Enzymlösung: 0,5 Proz. Pankreatin Rhenania in Phosphat p_H 7,5. Damit wurden zunächst folgende sechs Verdauungssysteme angesetzt:

I. 1. 50 ccm 4proz. Casein + 50 ccm Enzymlösung
2. 50 „ 4 „ „ + 10 „ „
+ 40 ccm Phosphat.
3. 50 ccm 4proz. Casein + 5 ccm Enzymlösung
+ 45 ccm Phosphat.

II. 1′. 50 ccm 4proz. Wittepepton + 50 ccm Enzymlösung
2′. 50 „ 4 „ „ + 10 „ Enzymlösung
+ 40 ccm Phosphat.
3′. 50 ccm 4proz. Wittepepton + 5 ccm Enzymlösung
+ 45 ccm Phosphat.

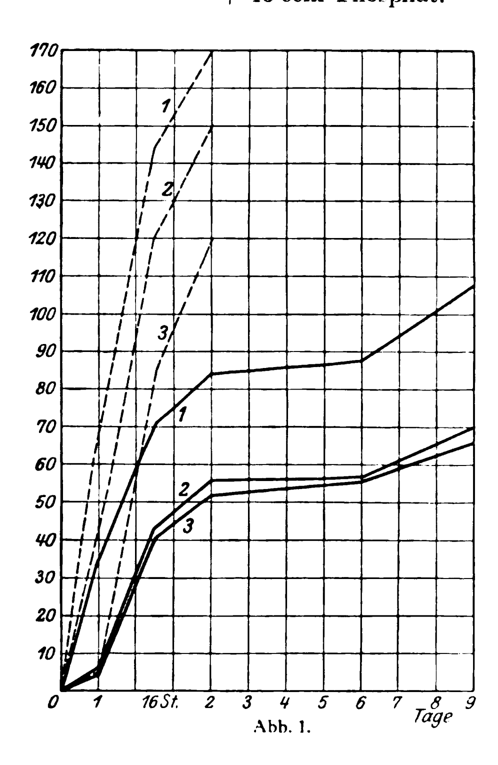


Abb. 1.

In Zeitabständen wurden den bei 37° stehenden Gemischen je 5 ccm für die van-Slykebestimmung entnommen (+ 5 ccm n/10 HCl, davon Doppelbestimmung in je 2 ccm) und je 1 ccm für den Mikrokjeldahl

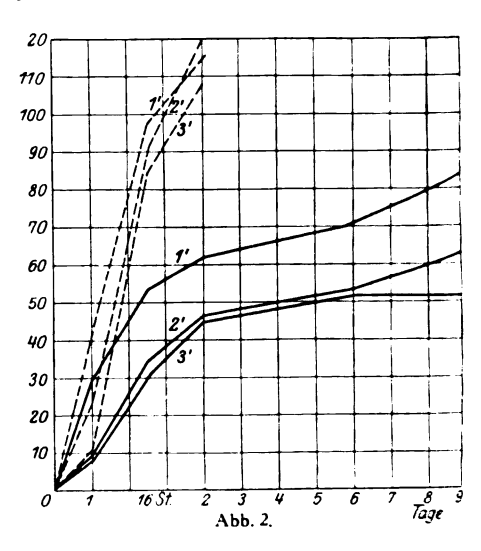


Abb. 2.

(+ 2 ccm Gerbsäurereagens nach *Hedin*, davon je 0,5 ccm für die Doppelanalysen). Die Werte sind in Abb. 1 und 2 graphisch verzeichnet, die ausgezogenen Linien entsprechen dem NH_3-N, die gestrichelten dem Kjeldahl-N, beides in mg/100 pro 1 ccm; die Zeiten sind auf der Abszisse mit abnehmendem Maßstab aufgetragen, die Kurven zeigen also nicht den wahren zeitlichen Verlauf, sind aber untereinander vergleichbar (Abb. 1 bis 3).

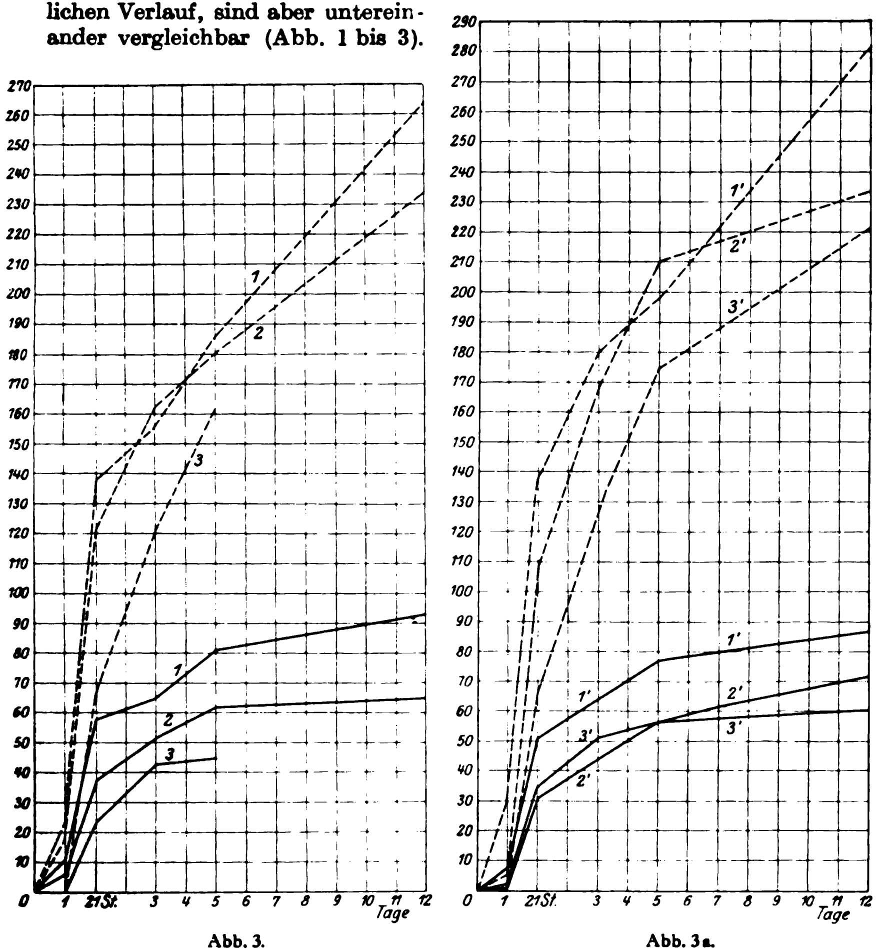


Abb. 3.

Abb. 3a.

Nach 6 Tagen des Aufenthalts bei 37° wurden den Verdauungsgemischen je 50 ccm entnommen und 3 Tage gegen mehrfach erneuerte je 100 ccm Phosphat dialysiert, danach betrugen die Volumina und der Gesamt-N der Lösungen:

1.	53 ccm,	1,56 mg N	in 0,5 ccm
2.	53 „	1,62 „ „	„ 0,5 „
3.	52 „	1,69 „ „	„ 0,5 „
1'.	53 „	1,60 „ „	„ 0,5 „
2'.	53 „	1,62 „ „	„ 0,5 „
3'.	53 „	1,62 „ „	„ 0,5 „

nach Zusatz von 20 ccm 4proz. Caseins.

Der neue Verdauungsansatz — 20 ccm je der sechs Lösungen + 20 ccm Casein — wurde 12 Tage bei 37° verfolgt, die Werte zeigt Abb. 3. Zu beachten ist, daß von den korrespondierenden Lösungen 1 und 1′, 2 und 2′ die caseinvorbehandelten den steileren Anstieg der NH_2-Werte zeigen, ferner, daß in den N_2-Werten die Lösungen 2 und 2′ die fünffach stärkeren 1 und 1′ einmal überholen. Im ganzen geben die beiden Kurvengruppen ähnliche Bilder, der NH_2-Wert von 3′ zeigt einen auffälligen Verlauf.

Während in dieser Reihe eines der vorbehandelten Substrate als Substrat für alle Lösungen diente, wurde in einer weiteren Serie ein drittes Substrat — Gelatine — verwandt.

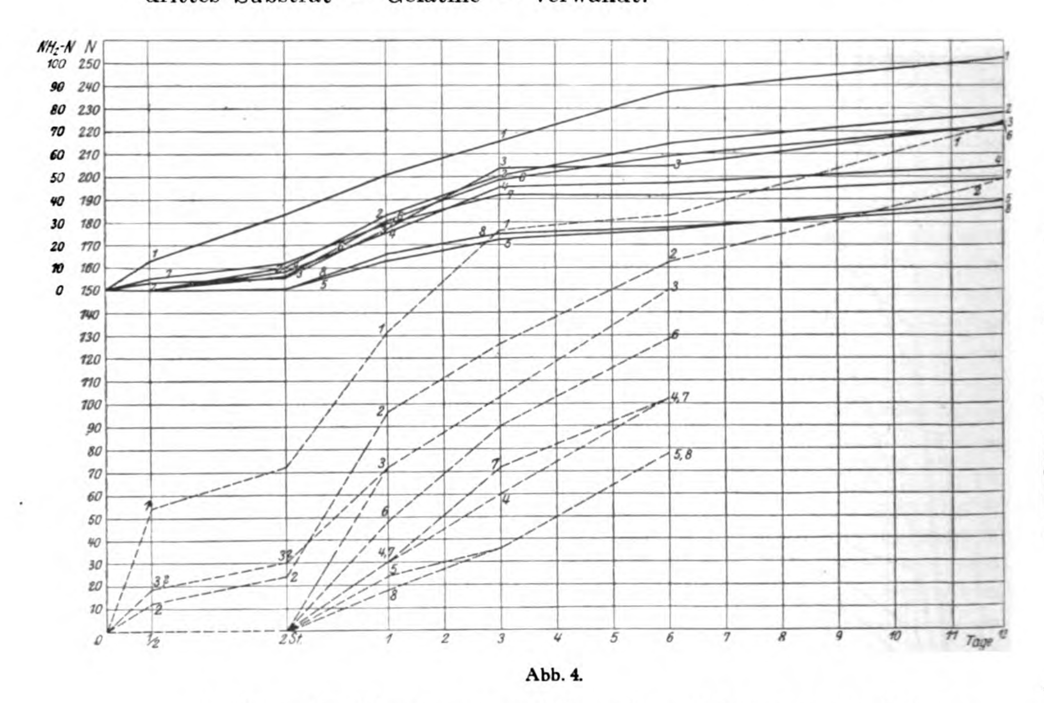


Abb. 4.

Je 30 ccm der Lösungen wie zu III wurden mit 20 ccm 6proz. Gelatine angesetzt, die N-Werte der sechs Gemische 1 bis 3′ in 0,5 ccm betrugen: 1,94, 2,03, 2,14, 1,99, 1,99, 2,05. Zum Vergleich wurden zwei Verdauungsreihen mit nicht vorbehandelten Enzymlösungen zugleich angesetzt:

1. 30 ccm 0,4proz. Pankreatin + 20 ccm 6proz. Gelatine.
2. 5 „ 0,4 „ „ + 20 „ 6 „ „
   + 25 ccm Phosphat.

In den Abb. 4 und 4a entsprechen die Kurven 3 bis 8 den bisherigen Lösungen 1 bis 3′, in 4a ist der Anfangsteil der NH_2-Kurven in größerem Maßstabe wiedergegeben, um den auffallenden Befund deutlich zu machen, daß die Werte der korrespondierenden Lösungen 4 und 7 denen der eingangs fünffach stärkeren 3 und 6 zuerst vorauseilen, um später dahinter zurückzufallen. Zum Verständnis darf wieder an die Vorstellung des Enzymablaufs erinnert werden. Bemerkenswert ist auch, wie die korrespondierenden

Kurven sich immer mehr zusammenfinden und gegen Ende von den anderen Paaren stärker scheiden, die Katalysetheorie ließe das Gegenteil erwarten.

Zur Auswertung der Kurven seien in nachstehenden Tabellen die Prozentzahlen zusammengestellt, die man erhält, wenn man den

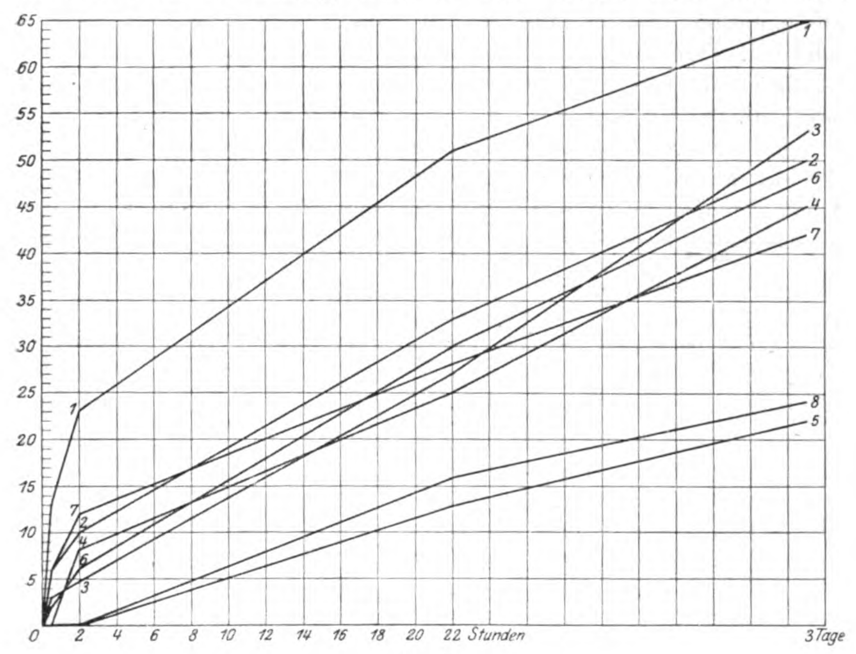


Abb. 4a.

	I und II			III				
	1 Std.	16 Stdn.	48 Stdn.	1 Std.	21 Stdn.	70 Stdn.	5 Tage	12 Tage
1	52	42	50	50	42	42	44	35
2	17	36	37	39	32	32	34	38
3	83	49	43	—	35	36	28	—
1′	69	55	54	30	37	36	39	31
2′	42	43	39	17	29	26	27	31
3′	75	36	42	—	—	40	33	27

	IV					
	$^1/_2$ Std.	2 Stdn.	22 Stdn.	72 Stdn.	6 Tage	12 Tage
1	24	32	39	35	45	44
2	50	42	34	40	40	39
3	—	—	50	63	41	—
4	—	—	83	75	46	—
5	—	—	55	61	33	—
6	—	—	63	53	42	—
7	—	—	93	58	41	—
8	—	—	89	67	38	—

NH_2-N als Anteil des nicht fallenden N berechnet. Natürlich sind die Prozentwerte zu hoch, da auch der Gerbsäureniederschlag NH_2-Gruppen enthält, doch ist der Gang der Werte von Interesse.

Bei langer Versuchsführung nähern sich die Prozentwerte einander an, immerhin sind sie zum Teil auch dann noch beträchtlich unterschieden. Im übrigen ist die Mannigfaltigkeit das Charakteristische, häufiger ist fallender Prozentwert, aber auch steigender kommt vor, wie z. B. in IV., 1.

Ordnet man bestimmten Werten unfällbar gewordenen Stickstoffs die aus den Kurven ersichtlichen jeweiligen NH_2-N-Werte zu, so bekommt man ebenfalls sehr verschiedene Werte.

NH_2-N in mg/100 von:	1	2	3	1′	2′	3′
Bei 50 mg/100 N_2 in I, II . . .	25	10	23	33	19	20
„ 100 mg/100 N_2 in I, II . . .	52	33	46	54	38	40
„ 50 mg/100 N_2 in III	22	18	18	15	14	26
„ 100 mg/100 N_2 in III	40	31	35	30	28	44
„ 150 mg/100 N_2 in III	63	48	45	55	39	53

In IV NH_2-N mg/100 von:	1	2	3	4	5	6	7	8
Bei 50 mg/100 N_2	13	18	20	38	24	31	35	26
„ 70 mg/100 N_2	31	24	28	45	26	40	41	27
„ 100 mg/100 N_2	41	32	50	47	—	51	42	—

Hierbei ergibt sich zwar keineswegs ein Parallelgehen von unfällbar gewordenem N_2 und freigesetzten Aminogruppen, wohl aber doch einige Regelmäßigkeit, so die exzentrische Lage der Werte für die mittlere Enzymkonzentration 2 und 2′, in I, II und zum größten Teil auch III nach unten, in IV nach oben.

Es wurde weiter eine Untersuchungsreihe angestellt mit Verdauung bei verschiedener Enzymkonzentration in Dialyseanordnung und Bausteinanalyse der Dialysate und der restierenden Innenlösung. Die Enzymkonzentrationen verhielten sich wie 1 : 10 (0,5- und 0,05proz. Pankreatin Rhenania), die stärkere machte 0,5 proz. Caseinlösung in Phosphat p_H 7,5, 37°, in einer halben Stunde auf Essigsäure caseinfrei, die schwächere in $6\frac{1}{2}$ Stunden.

Zu dem eigentlichen Versuch wurde als Grundlösung n/100 NaOH gewählt, je 1000 ccm wurden mit 25 g Casein beschickt und (Versuch I) auf 0,05 bzw. (Versuch II) 0,5 proz. Pankreatin (der gleichen Stammlösung) gebracht. Je 500 ccm wurden auf zehn große Schleicher-Schüll-Dialysierhülsen verteilt und zusammen gegen je 500 ccm n/100 NaOH dialysiert, 37°. Die Dialysate wurden morgens und abends entnommen (die Außenflüssigkeit erneuert) und eingedampft, schließlich über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. In I wurden die Trockenrückstände der beiden Parallelversuche vereinigt gewogen, in II getrennt (12 bzw. 24 Wägungen),

ebenso der nach Abbruch des Versuchs — 6 Tage — restierende Trockenrückstand der Binnenlösungen (ein bzw. zwei Wägungen).

Die Trockenrückstände wurden so weit vereinigt, wie zur Durchführung der *van Slyke*schen Bausteinanalyse erforderlich war, das ergab in I vier Rückstände von je 24 Stunden Dialyse, einen von 48 Stunden, in II drei von je 12, einen von 24, einen von 36 und einen von 48 Stunden,

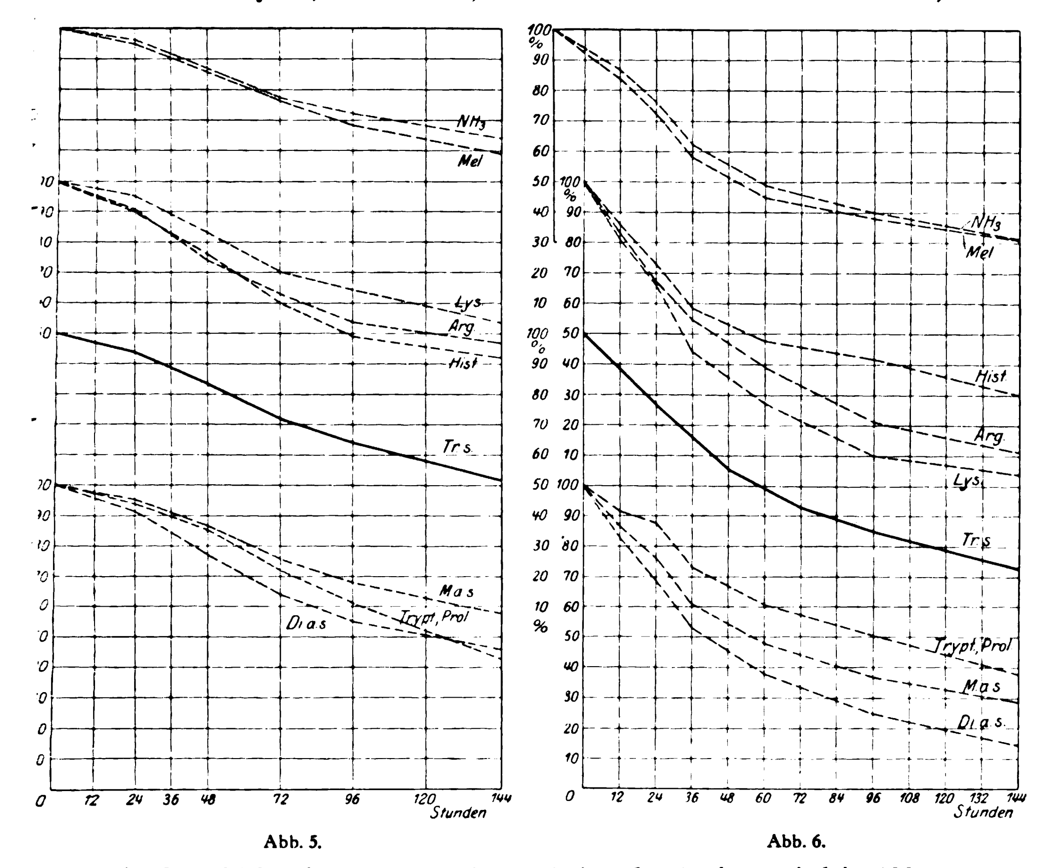


Abb. 5. Abb. 6.

in der Abfolge der 6 Tage. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abb. 5 (Versuch I) und 6 (Versuch II) graphisch in prozentischen Abnahmen des anfänglichen Dialyseinnern dargestellt. Die ausgezogenen Linien geben die Gesamtabnahme des Trockenrückstandes prozentisch an, die gestrichelten die des Stickstoffs, verteilt auf die Gruppen: NH_3 (als Ammoniak abspaltbarer Amidstickstoff), Mel. (Melanoidin-N), Lys. (Lysin), Arg. (Arginin), Hist. (Histidin), M. a. s. (Monoaminosäuren), Trypt. Prol. (Nichtaminostickstoff der Monoaminosäuren), D a. s. (Diaminosäuren + Cystin). Cystin wurde bestimmt, der Kleinheit der Werte wegen aber nicht graphisch verzeichnet. Ferner wurde der Phosphorgehalt im Ausgangscasein zu 0,76 Proz., in dem Pankreatin zu 1,59 Proz., in der Restbinnensubstanz von I zu 1,03 Proz., in der von II zu 1,35 Proz. bestimmt. In II würde der innen restierende Phosphor den mit dem Enzym zugeführten nicht erheblich

übersteigen, wohl aber in I, hier muß Caseinphosphor undialysiert geblieben sein (Abb. 5 und 6).

Die Kurven der Bausteingruppen sind im ganzen derjenigen der zugehörigen Trockensubstanzabnahme ähnlich, besonders in den Gruppen des Ammoniaks, der Melanoidine und der Monoaminosäuren, dagegen ist bei den Diaminosäuren ein stärkeres Absinken festzustellen. Das beachtenswerteste ist aber die Verschiedenheit in dem Verhalten der Gruppen, die zwischen den beiden Versuchsreihen besteht. So fällt in Abb. 5 die Histidinkurve steiler und um 10 Proz. tiefer als die des Lysins, in Abb. 6 sinkt umgekehrt von Anfang an das Lysin viel mehr und fast auf Null, während das Histidin in seinem Endwert noch oberhalb desjenigen der Trockensubstanz bleibt. Das gleiche Umkehrverhalten zeigen die Kurven der Tryptophan-Prolingruppe, in Abb. 5 liegt sie unterhalb der Monoaminosäurengruppe und sinkt sogar unter die Diaminosäuren, in Abb. 6 bleibt sie in ihrem ganzen Verlauf oberhalb jener beiden.

Ordnet man der gleichen prozentischen Abnahme der Binnensubstanz die gleichzeitigen Binnengehalte der Gruppen zu, so ergibt sich folgendes:

	I Proz.	II Proz.	I Proz.	II Proz.
Undialysiert	75	75	52	50
Nach Stunden . . .	65	26	144	55
		Gruppen:		
NH_3	80	75	64	51
Melanoidin	79	70	59	48
Lysin	74	63	54	30
Arginin	66	65	47	42
Histidin	65	71	42	50
Mon. am. sren . . .	79	74	58	50
Trypt. Prol.	76	84	43	64
Diaminosäuren . . .	67	66	46	41

Wäre der Wirkungsunterschied der verschiedenen Enzymkonzentrationen lediglich eine zeitliche Verschiebung, so wäre zu erwarten, daß die dialysierbaren Spaltstücke dieselben sein würden, der regelmäßige Verlauf der unterschiedlichen Kurven von Anfang an spricht für einen qualitativ verschiedenen Verlauf, wobei daran zu denken wäre, daß die primär entstandenen Spaltstücke — je nach ihrer Konzentration, Spaltungsgrad, Bindung mit dem Enzym usw. — ein variierendes Moment darstellen könnten.

Im Zusammenhang mit dieser Untersuchung tauchte die Frage auf, ob etwa das tryptische Enzym an sich die Bausteinzusammensetzung des Caseins zugleich mit der Aufspaltung verändere, ob also

die Bausteinanalyse zu Beginn und nach längerer Dauer der Verdauung verschiedene Werte liefere. Das ist in der Tat der Fall, und zwar auch in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration und der Zeitdauer.

Versuch 1. 3 Proz. Casein, 0,5 Proz. Pankreatin, Phosphat p_H 7,5, 37°, 6 Tage.

Versuch 2. 3,66 Proz. Casein, 0,33 Proz. Pankreatin, Phosphat p_H 7,5, 37°, 3 Wochen.

Versuch 3. 3,66 Proz. Casein, 0,03 Proz. Pankreatin, p_H 7,5, 37°, 3 Wochen.

Stickstoffverteilung.

	I		II		III	
	Anfang Proz.	Schluß Proz.	Anfang Proz.	Schluß Proz.	Anfang Proz.	Schluß Proz.
Ammoniak . .	10,1	11,2	9,9	10,9	9,8	10,6
Melanoidin . .	1,5	3,6	2,1	2,6	1,9	2,7
M a. s. . . .	60,7	60	61,6	62,5	60,8	60,1
Trypt. Prol. .	16,1	6,7	14,9	10,0	15,8	9,0
Diaminosäure .	27,6	25,7	26,4	23,9	27,4	26,5
Arginin	7,9	5,6	7,8	7,0	7,7	7,5
Lysin	7,5	8,7	7,6	9,1	7,9	7,9
Histidin . . .	11,5	10,7	10,7	7,2	11,1	10,3
Cystin	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,6

Die Verschiebungen sind mit der Abspaltung von Ammoniak, die ja für die tryptische Verdauung bekannt ist, allein nicht verständlich. Zum Vergleich wurde eine Caseinlösung ohne Enzym 3 Wochen im Thermostaten gehalten (wie immer unter Toluol) und vorher und nachher analysiert, allerdings war die Bereitung der Lösung etwas anders: es wurden 10 g in 35 ccm n/2 NaOH gelöst und auf 100 ccm mit der Phosphatlösung aufgefüllt. In die Tabelle sind außerdem zwei analoge Versuche mit Organeiweißauszügen aufgenommen, die einer Vororientierung zu der gleichen Frage im Bereich der Autolyse dienten.

I. Casein 10 Proz., II. Nieren von Rind, III. Leber von Rind, beides kolierte, zentrifugierte Auszüge mit 100 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung auf 75 g frische Organmasse. Dauer bei 37° 3 Wochen.

	I		II		III	
	Anfang Proz.	Schluß Proz.	Anfang Proz.	Schluß Proz.	Anfang Proz.	Schluß Proz.
NH_3	9,9	10,7	9,0	10,2	8,1	10,6
Melanoidin . .	5,8	2,4	3,6	4,2	5,8	5,7
M. a. s. . . .	58,5	61,0	61,5	61,2	57,0	55,0
Trypt. Prol. . .	12,0	13,3	14,5	9,4	9,1	10,5
Diaminosäure .	24,9	25,5	26,2	24,5	29,2	29,0
Arginin	6,1	6,7	10,0	7,9	10,8	7,0
Lysin	7,8	6,5	6,7	5,0	7,0	11,1
Histidin . . .	10,5	11,4	7,7	9,9	9,9	9,6
Cystin	0,5	0,5	1,9	1,2	1,4	1,35

Die Unterschiede in I zeigen nicht die für alle drei Versuche der voranstehenden Tabelle charakteristische Richtung, vor allem in den direkt bestimmten Werten, beherrschend ist die stärkere Melanoidinbildung in der ersten Hydrolyse, sie entspricht einer mehrfach gemachten Beobachtung, daß frisch bereitete, konzentriertere Lösungen wie auch Casein in Substanz bei der Hydrolyse mit HCl mehr — auch relativ — Melanoidinstickstoff ergab.

Anhang.

Analysenwerte zu den Abb. 1 bis 6.

Zu 1 bis 6: erste Zahl unter der Zeitangabe: Milligramm NH_2-N in 1 ccm, zweite Zahl mit Gerbsäure (1 : 2 ccm G. s.) nicht fällbarer N, bestimmt in 0,5 ccm, entsprechend 1/6 ccm der Verdauungslösung.

Nr.	0 Std.	1 Std.	16 Stdn.	48 Stdn.	6 Tage	9 Tage
			Abb. 1.			
1	0,28	0,62	0,99	1,12	1,16	1,36
	0,12	0,23	0,36	0,40	—	—
2	0,24	0,31	0,67	0,80	0,81	0,94
	0,06	0,13	0,26	0,31	—	—
3	0,15	0,20	0,56	0,67	0,71	0,81
	0,06	0,07	0,20	0,26	—	—
			Abb. 2.			
1′	0,53	0,82	1,06	1,15	1,24	1,57
	0,21	0,28	0,37	0,40	—	—
2′	0,41	0,51	0,75	0,88	0,95	1,04
	0,13	0,17	0,28	0,33	—	—
3′	0,32	0,41	0,62	0,77	0,84	0,82
	0,13	0,15	0,27	0,31	—	—

Abb. 3.

Nr.	0 Std.	1 Std.	21 Stdn.	70 Stdn.	5 Tage	12 Tage
1	0,36	0,48	0,94	1,01	1,17	1,29
	0,14	0,18	0,37	0,40	0,45	0,58
2	0,35	0,42	0,73	0,87	0,97	1,00
	0,12	0,15	0,32	0,39	0,42	0,51
3	0,36	0,35	0,59	0,79	0,81	—
	0,14	0,13	0,25	0,34	0,41	—
1′	0,43	0,52	0,94	1,07	1,20	1,30
	0,13	0,18	0,36	0,43	0,46	0,60
2′	0,41	0,42	0,72	0,85	0,91	1,13
	0,13	0,14	0,31	0,41	0,48	0,52
3′	0,30	0,32	0,64	0,81	0,88	0,90
	0,13	0,13	0,24	0,35	0,42	0,50

Abb. 4.

Nr.	0 Std.	1/2 Std.	2 Stdn.	22 Stdn.	72 Stdn.	6 Tage	12 Tage
1	0,23	0,36	0,46	0,74	0,88	1,10	1,25
	0,09	0,18	0,21	0,33	0,40	0,41	0,48
2	0,11	0,17	0,21	0,44	0,61	0,75	0,89
	0,08	0,10	0,12	0,24	0,29	0,35	0,41
3	0,42	0,45	0,47	0,69	0,95	0,96	1,15
	0,18?	0,21	0,23	0,30	0,35	0,43	—
4	0,37	0,37	0,45	0,62	0,82	0,84	0,90
	0,24	0,23	0,22	0,28	0,32	0,39	—
5	0,44	0,44	0,44	0,57	0,66	0,70	0,82
	0,21	0,23	0,21	0,25	0,27	0,34	—
6	0,46	0,48	0,52	0,76	0,94	1,04	1,18
	0,23	0,22	0,23	0,31	0,37	0,46	—
7	0,43	0,49	0,55	0,71	0,85	0,85	0,90
	0,21	0,21	0,21	0,26	0,33	0,38	—
8	0,41	0,41	0,41	0,57	0,65	0,68	0,86
	0,23	0,22	0,20	0,25	0,28	0,35	—

Zu Abb. 5 und 6: Die Zahlen der ersten Kolumne entsprechen den Rückständen der Dialysate, da der Wechsel der Außenflüssigkeit morgens und abends vorgenommen wurde, sind die Abstände nicht 12 und 12, sondern etwa 10 und 14 Stunden, die Prozentwerte der zweiten Kolumne sind darum nach den 24stündigen Werten errechnet.

V		VI		
g	Proz.	g	Proz.	
0,581	—	1,473 + 1,469	—	
0,816	6	1,215 + 1,201	23,3	
1,364	—	1,796 + 1,484	—	
1,123	10,6	0,933 + 0,889	22,0	
1,300	—	1,134 + 0,767	—	
1,363	11,3	0,661 + 0,434	12,8	
1,096	—	0,825 + 0,241	—	
0,793	7,9	0,404 + 0,278	7,3	
0,734	—	0,512 + 0,475	—	
0,697	6	0,186 + 0,186	5,9	
0,949	—	0,460 + 0,361	—	
0,605	6,6	0,336 + 0,292	6,0	
12,1911	51,5	3,1883 + 2,9682	22,7	Binnenwert

Prozentige N-Verteilung:

V

Dialysat	1, 2	3, 4	5, 6	7, 8	9, 10, 11, 12	Innen
Substanz	1,397	2,487	2,663	1,889	2,986	12,191
NH_3	6,2	7,1	7,4	5,5	8,0	4,6
Melanoidin	3,0	2,3	1,0	1,4	2,8	1,4
M. a. s.	57	57,6	65	65,8	66	73
Trypt. Prol.	10	—	10,3	14,1	11,9	7,5
Diaminosäure	34	33	27	26,9	23,3	22,7
Arginin	10,0	10,9	5,9	7,5	5,4	6,1
Lysin	8,7	10,7	9,2	7,3	11,0	9,7
Cystin	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,8
Histidin	15,2	10,9	11,6	11,7	6,6	7,0

VI

Dialysat	1	2	3	4, 5	6, 7, 8	9—12	Innen
Substanz	2,942	2,416	3,280	2,394	2,843	2,809	6,156
NH_3	7,2	6,7	7,1	6,8	6,4	7,5	9,1
Melanoidin	2,5	2,4	2,2	2,1	1,4	1,7	2,8
M. a. s.	64	63	66	65,6	65,5	65	75,2
Trypt. Prol.	8,1	4,9	12,7	12,0	12,2	20,3	20,5
Diaminosäure	27	28	24	26	27	25	12,8
Arginin	7,4	8,7	4,6	7,8	9,5	8,0	2,5
Lysin	11,4	11,8	12,9	11,7	13,7	5,8	1,5
Cystin	0,4	0,4	0,2	0,5	0,5	0,5	0,7
Histidin	7,4	7,4	6,5	5,5	3,0	10,9	8,1

	Hydrolysenwerte von		
	Casein	Pankreatin	in Substanz
NH_3	9,6	9,6	—
Melanoidin	5,7	6,4	—
Monoaminosäure	62,6	56,5	—
Trypt. Prol.	10,4	10,2	—
Diaminosäure	22,8	28	—
Arginin	5,9	14,9	—
Cystin	0,4	1,0	—
Lysin	9,0	4,9	—
Histidin	7,6	7,2	—

Über die Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2,3-Butylenglykol im Stoffwechsel der Hefe.

Von

A. J. Kluyver, H. J. L. Donker und F. Visser 't Hooft.

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der Technischen Hochschule zu Delft, Holland.)

(*Eingegangen am 16. Juni 1925.*)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Vor einiger Zeit haben zwei von uns (*Kluyver* und *Donker*) in einer vorläufigen Mitteilung[1]) über ein neu aufgestelltes Schema berichtet, das geeignet ist, eine zusammenfassende Übersicht von den Reaktionen zu geben, welche sich bei der dissimilatorischen Spaltung von Zucker durch Vertreter der verschiedensten Mikrobengruppen abspielen. In einer zweiten Abhandlung sind diese Betrachtungen zu einer allgemeinen Theorie des Chemismus der Dissimilationsprozesse erweitert worden[2]). Hier wird auf diese allgemeinen Ansichten nicht näher eingegangen werden, was sich um so mehr erübrigt, da hoffentlich bald eine ausgearbeitete Darstellung dieser Theorie in deutscher Sprache erscheinen wird.

Nur muß hier hervorgehoben werden, daß das aufgestellte Schema sich in erster Stelle gründet auf den von *Carl Neuberg* und seinen Mitarbeitern gelieferten, überaus wichtigen Nachweis, daß bei den verschiedenen Zuckergärungen primär die gleichen Spaltungen auftreten, und daß die beobachteten Unterschiede in den Gärungsprodukten nur auf Unterschiede in den sekundären Umwandlungen der primären Spaltungsprodukte zurückzuführen sind. In der aufgestellten Theorie ist zum erstenmal versucht worden, die von *Wieland* für die *aeroben* Atmungsprozesse aufgestellte Dehydrierungstheorie konsequent auf die *anaeroben* Dissimilationsprozesse durchzuführen. Indem weiter

[1]) *A. J. Kluyver* und *H. J. L. Donker*, Verslagen Kon. Akad. v. Wet. te Amsterdam **33**, 895, 1924.

[2]) *Dieselben*, ebendaselbst **34**, 237, 1925.

darauf hingewiesen wurde, welche Vorteile sich aus einem Zusammenbringen der *Wieland*schen und *Warburg*schen Ansichten über den Chemismus der *aeroben* Atmungsprozesse ergeben, hat sich eine überraschende Einheitlichkeit in den aeroben und anaeroben Atmungsvorgängen herausgestellt. Das Wesentliche in der Theorie ist, daß *alle* Teilprozesse bei der Zuckerzersetzung nichts anderes sind als gekuppelte Dehydrierungs- und Hydrierungsvorgänge.

Für die alkoholische Gärung nehmen wir im Anschluß an die Ausführungen *Neubergs* an, daß die Bildung von Alkohol resultiert aus einer Dehydrierung von Methylglyoxalhydrat, wobei normalerweise Acetaldehyd als Wasserstoffakzeptor auftritt und dabei in Alkohol übergeführt wird.

Während *Neuberg* diesen Vorgang als eine gemischte *Cannizzaro*umlagerung deutet, glauben wir jedoch, daß die mehr allgemeine Formulierung dieses Prozesses als gekoppelte Dehydrierung und Hydrierung den Vorzug verdient. Also:

$$CH_3COC\begin{matrix}/OH\\-OH\\\backslash H\end{matrix} + \text{Akzeptor} \rightarrow CH_3COC\begin{matrix}\diagup OH\\ \diagdown\!\!= O\end{matrix} + \text{Akzeptorwasserstoff}$$

$$CH_3COC\begin{matrix}\diagup OH\\ \diagdown\!\!= O\end{matrix} \rightarrow CH_3C\begin{matrix}\diagup H\\ \diagdown\!\!= O\end{matrix} + CO_2.$$

Normalerweise ist der in der ersten Gleichung auftretende Akzeptor Acetaldehyd, wobei dieser in Äthylalkohol übergeführt wird.

Diese Formulierung gewährt nun aber sofort einen Einblick in die Folgen einer Zufügung anderer Wasserstoffakzeptoren während der Zuckervergärung. Obgleich *Neuberg* für die reduzierende Wirkung von in Gärung versetzten Zuckerlösungen auf die verschiedensten Substanzen die glänzendsten experimentellen Beweise beigebracht hat (man sehe seine bekannten Arbeiten über „Phytochemische Reduktionen"), waren bis jetzt die Konsequenzen eines derartigen Eingriffs in den normalen Gärungsvorgang auf die Umwandlungen des Zuckermoleküls noch ziemlich im Dunklen geblieben. Das aufgestellte Schema berechtigte nun sofort zu dem Schluß, daß diese Zufügung von Wasserstoffakzeptoren, welche einen Teil des normalerweise vom Acetaldehyd akzeptierten Wasserstoffs abfangen werden, primär zur Entstehung von äquivalenten Quantitäten Acetaldehyds führen mußte.

Nun haben *Neuberg* und *Reinfurth*[1]) vor einiger Zeit auch dargetan, daß Zufügung von Acetaldehyd als solchem zu einer gärenden Zuckerlösung zur Folge hat, daß der Aldehyd nahezu quantitativ in Acetylmethylcarbinol (= Acyloin = Dimethylketol) übergeführt wird.

---

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **143**, 553, 1923.

Unter diesen Umständen konnte es kaum einem Zweifel unterliegen, daß in den Fällen, wo absichtlich eine als Wasserstoffakzeptor geeignete Substanz in das Gärungsmedium zugesetzt würde, auch die Bildung von Acetylmethylcarbinol direkt aus dem Zucker nachzuweisen sein würde.

Wie wir in einer am 30. November des vorigen Jahres der „Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam" vorgelegten Mitteilung angeführt haben, haben unsere Versuche die obengenannte Erwartung durchaus bestätigt. Nur muß hier bemerkt werden, daß man bei diesen Versuchen einer Komplikation Rechnung tragen muß. Das Acetylmethylcarbinol kann nämlich auch selbst als Wasserstoffakzeptor auftreten, wobei es in 2, 3-Butylenglykol übergeführt wird, nach der Gleichung:

$$CH_3COCHOHCH_3 + 2\,H \rightarrow CH_3CHOHCHOHCH_3.$$

Diese Umsetzung wird in den Fällen auftreten, wo das primär gebildete Carbinol nicht von einem Überschuß eines anderen geeigneten Wasserstoffakzeptors geschützt wird.

Es muß hervorgehoben werden, daß die Bildung von Acetylmethylcarbinol und von 2, 3-Butylenglykol aus Zucker (in Quantitäten bis zu 20 Proz. des zersetzten Zuckers) schon 1906 von *Harden* und *Walpole* bei der normalen Zuckervergärung durch *B. lactis aerogenes* nachgewiesen worden ist [1]; später haben *Harden* und seine Mitarbeiter das Auftreten dieser Produkte auch schon durch eine Kondensation von intermediär gebildetem Acetaldehyd zu Acetylmethylcarbinol und nachherige Reduktion dieser Substanz zu 2, 3-Butylenglykol erklärt [2]. Auch *Lemoigne* hat in einer Reihe von Veröffentlichungen das Auftreten der beiden genannten Substanzen im Stoffwechsel verschiedener Bakterien dargetan [3].

Für die alkoholische Gärung war jedoch die direkte Entstehung von Acetylmethylcarbinol aus Zucker (also nicht aus hinzugefügtem Acetaldehyd) noch nicht nachgewiesen worden, während auch über die Bildung von 2, 3-Butylenglykol bei der alkoholischen Zuckervergärung noch gar keine Angaben vorhanden waren. Nur darf nicht unerwähnt bleiben, daß einige ältere französische Chemiker über das Vorkommen von Isobutylenglykol $\left[{CH_3 \atop CH_3}\!>\!COHCH_2OH\right]$ unter den Produkten der alkoholischen Gärung berichtet haben. Wie auch von *Harden* schon bemerkt wurde, ist es durchaus wahrscheinlich, daß hier in Wirklichkeit 2, 3-Butylenglykol vorgelegen hat.

---

[1]) *A. Harden* and *G. S. Walpole*, Proc. Roy. Soc., Ser. B., **77**, 399, 1906.

[2]) *A. Harden* and *D. Norris*, ebendaselbst **84**, 492, 1912.

[3]) *M. Lemoigne*, Ann. de l'Inst. Pasteur **27**, 856, 1913; C. r. de la Soc. de Biol. **82**, 984, 1919; **83**, 336, 1920; C. r. de l'Acad. de Sc. **177**, 652, 1923; C. r. de la Soc. de Biol. **88**, 467, 1923.

Die Möglichkeit, kleine Mengen Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol nachzuweisen, war nun vorhanden, seitdem *Lemoigne* eine durchaus spezifische Reaktion dafür angegeben hat[1]). Das Prinzip der *Lemoigne*schen Methode ist, daß man das Acetylmethylcarbinol durch vorsichtige Oxydation mittels Ferrichlorid in das leicht flüchtige Diacetyl überführt. Diese letzte Substanz wird dann überdestilliert und im Destillat durch Einwirkung von Hydroxylamin und Nickelchlorid bei Anwesenheit von Ammoniak in das charakteristische Nickeldimethylglyoxim umgesetzt. Das 2, 3-Butylenglykol wird von Ferrichlorid nicht angegriffen, jedoch wohl von einem kräftigeren Oxydationsmittel, wie Brom, wobei es ebenfalls für einen ansehnlichen Teil in Diacetyl verwandelt wird, das dann wieder auf die eben auseinandergesetzte Weise nachgewiesen werden kann.

Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, daß diese Reaktion den Vorzug verdient vor allen anderen Verfahren, die bis jetzt für den Nachweis der genannten Körper vorgeschlagen sind. So ist die wohl benutzte Eigenschaft des Acetylmethylcarbinols, *Fehling*sche Lösung zu reduzieren, durchaus unspezifisch, während die Bereitung des Osazons nur ausführbar ist, wenn größere Quantitäten vorliegen. Der Nachweis des 2, 3-Butylenglykols in kleinen Mengen ist sogar auf andere Weise kaum möglich.

Während diese *Lemoigne*sche Methode gute Resultate gibt in den Fällen, wo die genannten Substanzen in reinen wässerigen Lösungen vorliegen, haben wir uns gezwungen gesehen, die Ausführung der Methode mit Beibehaltung des Prinzips einigermaßen abzuändern in der Weise, daß es möglich wird, die erwähnten Oxydationen direkt im Gärungsmedium vorzunehmen.

Nachdem wir zuerst die benutzte Methode beschrieben haben, werden wir dazu übergehen, die Ergebnisse wiederzugeben, zu denen das Studium der Bedingungen des Auftretens von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol im Stoffwechsel der Hefe geführt hat.

II. Die benutzte Methode zum Nachweis von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol.

Auf Grund zahlreicher Versuche haben wir die unten folgende Vorschrift zum Nachweis von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol ausgearbeitet, wobei, wie schon gesagt, das von *Lemoigne* angegebene Prinzip beibehalten ist.

Wenn eiweißreiche Flüssigkeiten, wie z. B. mit Mazerationssaft vergorene Zuckerlösungen untersucht werden sollen, empfiehlt es sich, den größten Teil der Eiweißstoffe zu entfernen, indem man dieselben durch

[1]) *M. Lemoigne*. Ann. de l'Inst. Pasteur **27**, 856, 1913; C. r. de l'Acad. de Sc. **170**, 131, 1920.

vorsichtiges kurzes Aufkochen der Flüssigkeit, koagulieren läßt und sie dann entweder durch Filtrieren oder durch Zentrifugieren ausscheidet.

Für die Untersuchung pipettiere man etwa 15 ccm in einen Jenarundkolben von 300 ccm Inhalt. Besonders wenn Flüssigkeiten mit großem Gehalt an organischen Substanzen vorliegen, soll diese Quantität nicht überschritten werden, ohne zu gleicher Zeit auch die Quantitäten der angewandten Reagenzien zu erhöhen. Hierauf werden 10 ccm 20proz. wässeriger Ferrichloridlösung zugefügt. Wir haben nun weiter festgestellt, daß die Oxydation des Acetylmethylcarbinols am besten vor sich geht, wenn das Medium schwach sauer ist. Daher fügen wir immer 1 ccm n/2 Essigsäure zu, wenn das Medium neutral ist, oder gegebenenfalls so viel mehr als nötig ist, um diesen Säuregrad zu bekommen. Nachdem ein Stückchen Bimsstein, und, wenn zu erwarten ist, daß die Flüssigkeit schäumen wird, 2 Tropfen reiner Ölsäure in den Kolben gebracht sind, werden langsam 10 ccm in ein Reagenzglas abdestilliert. Im Destillat wird folgenderweise auf die Anwesenheit von Diacetyl geprüft.

Zuerst wird die Flüssigkeit mit gesättigter Sodalösung genau auf Lackmus neutralisiert, wobei ein Überschuß ängstlichst vermieden wird, weil das Diacetyl in alkalischer Lösung leicht Umwandlungen unterliegt. Hierauf wird 1 ccm einer 20proz. wässerigen Lösung von salzsaurem Hydroxylamin und 2 ccm einer 20proz. wässerigen Natriumacetatlösung zugefügt und dann die Flüssigkeit eine kurze Zeit aufgekocht. Hierbei wird das Diacetyl in das Dimethylglyoxim verwandelt. Jetzt fügt man 5 Tropfen einer 10proz. wässerigen Nickelchloridlösung zu und kocht abermals auf. Wenn viel Diacetyl vorhanden ist, fällt das Nickeldimethylglyoxim schon während des Aufkochens in den bekannten roten Nadeln aus. Tritt dies nicht ein, so wird unter dem Wasserhahn abgekühlt, wobei noch öfters ein Niederschlag entsteht.

Der Unterschied von der *Lemoigne*schen Vorschrift ist vor allem darin gelegen, daß wir sowohl die Kondensation des Diacetyls mit dem Hydroxylamin, wie auch die Bildung des Nickelsalzes des Dimethylglyoxims in stark gepufferter Natriumacetatlösung vornehmen. *Lemoigne* dagegen benutzt statt Natriumacetat Ammoniak, was wir nicht empfehlen können, da bei Einwirkung von Ammoniak auf Diacetyl ebenfalls Kondensation eintritt. In der ersten Zeit, als wir noch nach der ursprünglichen Vorschrift arbeiteten, haben wir sogar öfters konstatiert, daß einmal gebildetes Nickeldimethylglyoxim nach dem Umschütteln und Aufkochen der Flüssigkeit wieder verschwand.

Wenn die zu untersuchende Flüssigkeit viel Acetylmethylcarbinol enthält, wird die Destillation so lange fortgesetzt, bis das Destillat keine Reaktion auf Diacetyl mehr gibt, wozu immer 10 ccm Wasser in den Kolben zugesetzt und hierauf wieder 10 ccm abdestilliert werden.

Nachdem auf diese Weise alles Acetylmethylcarbinol entfernt worden ist, eignet sich der Rückstand für die Prüfung auf die Anwesenheit von 2, 3-Butylenglykol, das, wie schon bemerkt, mittels Brom ebenfalls zu Diacetyl oxydiert wird. Wir stießen bei unseren diesbezüglichen Versuchen jedoch auf die merkwürdige Tatsache, daß reines 2, 3-Butylenglykol — isoliert aus einer mit *B. acrogenes* angestellten Zuckervergärung — in wässeriger Lösung entweder gar nicht von Brom angegriffen wird oder doch nicht in Diacetyl übergeführt wird. Wohl gelang die Oxydation, und zwar in guter Ausbeute, wenn vorher eine genügende Menge Ferrichlorid zugesetzt worden war. Offenbar ist also das Ferrisalz ein unentbehrlicher

Katalysator für die Bromoxydation[1]). Daher empfiehlt es sich, die Untersuchung immer nur im Rückstand der auf Acetylmethylcarbinol in der beschriebenen Weise geprüften Flüssigkeit auszuführen, was um so mehr geboten ist, weil das Carbinol entfernt sein soll, bevor auf die Anwesenheit von 2, 3-Butylenglykol geschlossen werden darf.

Während nun die Oxydation des 2, 3-Butylenglykols mittels Brom und Ferrichlorid in reiner wässeriger Lösung sehr gut verläuft, ergeben sich Schwierigkeiten, wenn die zu prüfende Lösung noch merkliche Quantitäten unvergorener Zucker oder sonstiger organischer Substanzen enthält, denn das Brom wird auch auf diese Substanzen oxydierend wirken, wobei Bromwasserstoff in großer Konzentration gebildet wird. Diese starke Säurekonzentration wirkt entweder hemmend auf die Oxydation des 2, 3-Butylenglykols oder ist Ursache, daß der nachträgliche Nachweis des Diacetyls im Destillat fehl schlägt. Wir haben diese Schwierigkeit überwunden, indem wir die Bromoxydation immer in Gegenwart einer größeren Menge Natriumacetats vornehmen. Die hieraus vom Bromwasserstoff gebildete Essigsäure stört noch bei der Oxydation noch nach Neutralisation mit Sodalösung beim Nachweis des Diacetyls.

Hieraus ergibt sich die folgende Arbeitsweise. Die bei der Prüfung auf Acetylmethylcarbinol zurückgebliebene abdestillierte Flüssigkeit wird mit 2 ccm Brom und 3 g festem Natriumacetat 20 Minuten am Rückflußkühler auf einem kochenden Wasserbade erhitzt, wobei auf eine intensive Kühlung acht zu geben ist. Hierauf wird der Kolbeninhalt auf Zimmertemperatur abgekühlt und der Überschuß des Broms nach Abgießen des noch vorhandenen flüssigen Broms genau mit einer konzentrierten Lösung von Natriumthiosulfat fortgenommen, was durch Tüpfelung unter Anwendung eines *feuchten* Jodkaliumstärkepapiers festzustellen ist. Dann werden wiederum langsam 10 ccm abdestilliert und das Destillat abermals auf die beschriebene Weise auf die Anwesenheit von Diacetyl geprüft.

III. Die Versuche bezüglich der Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol durch Hefe.

A. Versuche mit Preßhefe.

Um die Übersicht zu erleichtern, haben wir die Ergebnisse unserer unter diese Aufschrift fallenden Versuche in Tabelle A zusammengefaßt, welche wohl keiner näheren Erläuterung bedarf[2]).

Wie wir in I. auseinander gesetzt haben, war die direkte Anleitung unserer Versuche die Wahrscheinlichkeit, daß Zufügung von Wasserstoffakzeptoren zu gärenden Glucoselösungen zur Bildung entweder von Acetylmethylcarbinol oder von 2, 3-Butylenglykol führen würde.

Um die Richtigkeit dieser Hypothese zu prüfen, vergoren wir eine Methylenblau oder Schwefel enthaltende Glucoselösung mit Preß-

---

[1]) *Harden*, der zuerst die Oxydation von 2, 3-Butylenglykol zu Diacetyl zur Identifizierung der erstgenannten Substanz vorschlug, benutzte keine Eisensalze, doch berichtet er, daß die Oxydation nur mit Hilfe des Sonnenlichtes auf lange Dauer erfolgreich vorzunehmen ist.

[2]) Die Tabellen geben nur einen Auszug aus den Versuchsprotokollen wieder; alle Versuche sind mehrfach wiederholt worden.

hefe. Die benutzte Preßhefe war die sogenannte „Koningsgist" der „Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek" zu Delft. Die Hefe erwies sich als sehr rein, und indem wir die Versuchsdauer auf 3 Stunden beschränkten, hatten wir die Gewißheit, daß eine eventuelle Bildung der genannten Substanzen der Hefe selber und nicht eventuell verunreinigenden Organismen zugeschrieben werden mußte.

Tabelle A.

Versuche mit Preßhefe auf kurze Dauer.

Bei allen Versuchen wurden 3 g Preßhefe und 30 ccm Wasser oder 10proz. wässerige Zuckerlösung benutzt. Versuchstemperatur 30° C.

Nr.	Versuch	Zugefügter Wasserstoffakzeptor	Versuchsdauer Stunden	Acetylmethylcarbinol	2, 3-Butylenglykol
1	Preßhefe A in Wasser	—	3	—	—
2	Preßhefe A in Glucoselösung	—	3	—	Spur
3	Preßhefe A in Fructoselösung	—	3	—	++
4	Preßhefe A in Glucoselösung	0,1 proz. Methylenblau	3	—	++
5	Preßhefe A in Glucoselösung	3 Proz. Schwefel	3	—	++
6	Preßhefe A in Wasser	Kräft. Aeration	3	—	Spur
7	Preßhefe A in Glucoselösung	„ „	3	—	++
8	Preßhefe B in Wasser	—	0	Spur	+
9	Preßhefe B in Glucoselösung	Kräft. Aeration	3	—	+++
10	Preßhefe B in Glucoselösung + m/2 K_2HPO_4	—	4	—	++
11, 12	Preßhefe C und D in Wasser	—	0	—	Spur
13, 14, 15	Preßhefe E, F, G in Wasser .	—	0	—	—

Die Ergebnisse entsprachen völlig unseren Erwartungen, denn es zeigte sich, daß nach der genannten Frist in den mit Methylenblau oder mit Schwefel versetzten Glucoselösungen eine merkliche Menge von 2, 3-Butylenglykol gebildet worden war (Versuche 4 und 5 der Tabelle A).

Selbstverständlich wurde neben diesen mehrfach wiederholten Versuchen nachgegangen, inwieweit auch bei Vergärung von Glucose ohne Wasserstoffakzeptorenzusatz unter den genannten Bedingungen Acetylmethylcarbinol oder 2, 3-Butylenglykol entsteht. In der Tat zeigte es sich, daß auch bei der normalen Glucosevergärung immer 2, 3-Butylenglykol nachzuweisen ist[1]), wenn auch die gebildete Menge

[1]) In unserer oben zitierten vorläufigen Mitteilung haben wir berichtet, daß die Reaktion auf 2, 3-Butylenglykol für die reine Glucoselösung völlig negativ war. Dieser Widerspruch findet seine Erklärung darin, daß wir damals noch nach der ursprünglichen *Lemoigne*schen Vorschrift arbeiteten, wobei, wie wir in II auseinandersetzten, leicht Störungen auftreten.

sehr zurücksteht im Vergleich mit den Mengen, welche beim Zusatz von den Wasserstoffakzeptoren entstehen (Versuch 2).

Es schien uns nun angebracht festzustellen, wie Fructose sich in dieser Hinsicht verhielt. Die Tatsache, daß diese Zuckerart von verschiedenen Vertretern der Gruppe der wahren Milchsäurebakterien für einen nicht unbeträchtlichen Teil zu Mannit reduziert wird, ließ es wahrscheinlich erscheinen, daß Fructose im Gegensatz zu Glucose auch bei der alkoholischen Gärung selbst eine wasserstoffakzeptierende Wirkung entfalten könnte. In diesem Falle dürfte man erwarten, daß bei Vergärung von Fructose ohne jeden Zusatz schon eine merkliche Acetylmethylcarbinol- bzw. 2, 3-Butylenglykolbildung auftreten würde. Wie aus Versuch 3 der Tabelle A hervorgeht, wurde diese Vermutung durchaus bestätigt. Weil es uns trotz vieler Mühe nicht gelungen ist, die Bildung von Mannit festzustellen, ist es, auch auf Grund theoretischer Überlegungen, worauf hier nicht näher eingegangen werden kann, wahrscheinlich, daß es nicht die Fructose an sich, sondern ein aus ihr gebildetes Spaltungsprodukt ist, welches in diesem Falle die Akzeptorwirkung ausübt. Es ist uns noch nicht gelungen, dieses Spaltungsprodukt zu identifizieren (vgl. auch die diesbezüglichen Versuche unter B.).

Auf Grund der vorhergehenden Ergebnisse war nun zu erwarten, daß auch der Luftsauerstoff, der für viele aerobe Organismen den einzigen genügend kräftigen Akzeptor bildet, imstande sein würde, bei der alkoholischen Gärung als Wasserstoffakzeptor aufzutreten. Tatsächlich erwies sich nun eine kräftige Lüftung einer gärenden Glucoselösung als ein durchaus geeignetes Mittel, um die 2, 3-Butylenglykolbildung zu erzwingen (Versuche 7 und 9).

Schließlich war zu erwarten, daß bei Vergärung der Glucose im alkalischen Medium (*Neubergs* dritte Vergärungsform) Butylenglykolbildung auftreten würde. Die im Vordergrunde stehende Umlagerung des Acetaldehyds in Alkohol und Essigsäure wird wohl nicht so glatt vor sich gehen, daß auch nicht ein Teil des Acetaldehyds der Kondensation unterliegt. Auch diese Erwartung hat sich erfüllt (Versuch 10).

Beim Anfang der oben beschriebenen Versuche hatten wir uns davon überzeugt, daß die benutzte Hefe an sich weder Acetylmethylcarbinol noch 2, 3-Butylenglykol enthielt (Versuch 1). Als wir dieses Ergebnis später noch einmal nachprüften, erhielten wir das unerwartete Resultat, daß die zweite Hefenprobe eine deutlich nachweisbare Menge Butylenglykol und sogar eine Spur Acetylmethylcarbinol enthielt (Versuch 8).

Eine Erweiterung dieser Versuche auf eine große Anzahl Hefenmuster ergab nun, daß in der Tat einzelne Muster deutlich Butylen-

glykol enthielten, andere dagegen zweifellos negative Reaktionen gaben. Da wir diese Muster einer Hefenfabrik verdankten, worin sehr verschiedene Rohstoffe nach verschiedenen Verfahren auf Hefe verarbeitet werden, ist es nachträglich durchaus verständlich, daß wir auf diese auseinandergehenden Resultate stießen (Versuche 11 bis 15).

Wichtig ist also die Tatsache, daß man bei allen Versuchen über Acetylmethylcarbinol- und Butylenglykolbildung durch Hefe das benutzte Hefenmaterial, wie auch den eventuell benutzten Mazerationssaft oder Hefenextrakt zuerst auf die genannten Substanzen zu prüfen hat.

B. Versuche mit Mazerationssaft.

Es schien uns nun von Bedeutung, die Versuche auszudehnen auf die Vergärung von Zucker durch den *Lebedew*schen Mazerationssaft. Weil hier ein mehr direkter Kontakt des wasserstoffaktivierenden Agens mit den zugefügten Wasserstoffakzeptoren in hoher Konzentration eintritt, war hier ein kräftiges Wasserstoffabfangen und demnach auch eine kräftige Acetylmethylcarbinol- oder Butylenglykolbildung zu erwarten.

Der benutzte Mazerationssaft war genau nach den Angaben *Lebedews* aus einer Trockenhefe bereitet, die wir durch Trocknung einer uns von der Bierbrauerei „d'Oranjeboom" zu Rotterdam freundlichst überlassenen Bierunterhefe erhielten.

Es stellte sich heraus, daß die zu verschiedenen Daten bereiteten Mazerationssäfte in ihren Eigenschaften deutliche Unterschiede aufwiesen. So war Mazerationssaft A dadurch gekennzeichnet, daß er schon an sich deutliche Mengen Butylenglykol enthielt (Versuch 16). Wir sind geneigt, dies dem Umstande zuzuschreiben, daß die verarbeitete Bierhefe eine merkliche Quantität Glykogen enthielt, aus welcher Substanz das Butylenglykol bei der deutlich wahrnehmbaren Selbstgärung während der Mazeration gebildet wurde.

Für Versuche über die Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol war also dieser Saft unbrauchbar. Die aus weiteren Hefensendungen bereiteten Mazerationssäfte zeigten nun eine sehr merkwürdige Erscheinung, die sie ebenfalls für unseren Zweck unbrauchbar machten und worüber wir hier kurz berichten möchten. Es zeigte sich nämlich, daß der Mazerationssaft, welcher Glucose in 10proz. Lösung sofort kräftig vergor, in den ersten 5 bis 8 Stunden Fructose in gleich starker Lösung gar nicht angriff. Nach diesem Zeitverlauf trat dann aber auch rasche Vergärung ein. Weil man immer angegeben findet, daß Fructose von lebender Hefe, wie insbesondere auch von Mazerationssaft rascher vergoren wird wie Glucose, haben wir zuerst gemeint, daß die von uns benutzte Fructose irgend eine hemmende

Tabelle B.

Versuche mit Mazerationssaft.

Bei allen Versuchen wurden 16 ccm Mazerationssaft benutzt, wozu eventuell 10 Proz. Zucker zugefügt wurden. Versuchstemperatur 30° C.

Nr.	Mazerationssaft	Benutzte Zucker	Zugefügter Wasserstoffakzeptor	Versuchsdauer Stunden	Acetylmethylcarbinol	2, 3-Butylenglykol
16	A	—	—	3	—	++
17	B	—	—	5	—	—
18	B	Glucose	—	5	—	—
19	B	Fructose	—	5	+	Spur
20	C	—	—	2	—	—
21	C	—	—	4	—	Spur
22	C	Glucose	—	2	Spur	—
23	C	Fructose	—	2	++	—
24	C	Glucose	—	4	Spur	—
25	C	Fructose	—	4	++	—
26	C	Glucose	Methylenblau	2	++	—
27	C	5 proz. Dioxyaceton 5 proz. Glucose	—	3	—	—
28	C	Dioxyaceton	—	3	—	—
29	C	—	Kräft. Aeration	2	—	—
30	C	Glucose	„ „	2	—	—

oder giftige Substanz enthielt. Wir haben die Versuche deshalb wiederholt mit Fructose sehr verschiedener Provenienz, doch dabei immer dasselbe Resultat erhalten.

Nun ist das Auftreten einer derartigen „Induktionszeit" bei Gärversuchen mit Mazerationssaft in der Literatur schon mehrmals beschrieben. Wir erinnern hier nur an die Beobachtungen *Meyerhofs*[1]), der zeigte, daß die Induktionszeit sehr verlängert wird durch Zusatz von Phosphaten in das Gärungsmedium. Dabei ist jedoch zu erwähnen, daß *Meyerhof* angibt, daß Glucose und Fructose sich in dieser Hinsicht ziemlich gleich verhalten. Nur Saccharose zeigte meistens eine bedeutend kürzere Induktionszeit. Besonders bemerkenswert ist die von uns beobachtete lange Induktionszeit der Fructose angesichts der Resultate von *Euler, Ohlsen* und *Johansson*[2]), welche bei bestimmten Trockenhefen, die nicht zur Kohlensäurebildung befähigt waren, eine Hemmung der Umwandlung des Zuckers in die veresterbare Form feststellten, und zwar nur bei Glucose und Mannose, nicht bei Fructose. *Euler* und seine Mitarbeiter sind geneigt, diese Resultate derart zu deuten, daß die beiden erstgenannten Zucker bei der Vergärung zuerst in eine der Fructose sehr nahestehende Hexose verwandelt werden. Die von uns festgestellten Tatsachen zeigen nun, daß diese Erklärung jedenfalls keine allgemeine Gültigkeit besitzt, doch sind wir nicht imstande, eine mehr befriedigende Erklärung der beobachteten Erscheinungen zu geben. Wir wollen nur noch bemerken, daß Mazerationssaft aus einer Trockenhefe, welche einer von uns (*Visser 't Hooft*) während eines kurzen Aufenthaltes in dem Institut für Gärungsgewerbe durch die freundliche Vermittlung von Dr. *M. Haehn* aus Unterhefe der Schultheissbrauerei bereitete, sich in ebenso anomaler Weise der Fructose gegenüber verhielt.

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185, 1918.

[2]) *H. Euler, Ohlsen* und *Johansson*, diese Zeitschr. **84**, 403, 1917.

Inzwischen war es uns gelungen, durch Verarbeitung neuer Sendungen Bierunterhefe der Brauerei „d'Oranjeboom" ganz normale Mazerationssäfte zu bekommen, die auch frei von Acetylmethylcarbinol und Butylenglykol (Versuch 17) waren.

Besonders Mazerationssaft C zeichnete sich durch außerordentlich starke Gärkraft aus. Bemerkenswert dabei ist, daß während einer Inkubation von 4 Stunden (nicht aber von 2 Stunden) eine Spur Butylenglykol im Blankoversuch gebildet wurde (Versuche 20 und 21).

Sowohl mit Mazerationssaft B wie mit Saft C haben wir die mit lebender Hefe erhaltenen Resultate nachgeprüft. Wie aus Tabelle B ersichtlich ist (Versuche 18, 19, 22, 23 und 25), kamen wir auch hier zu dem Resultat, daß Fructose eine Wasserstoffakzeptorwirkung zeigt, indem sich deutliche Mengen Acetylmethylcarbinol bilden. Das gleiche gilt auch für Methylenblau bei der Glucosevergärung (Versuch 26). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der mit lebender Hefe vergorenen Zuckerlösungen lehrt, daß insofern ein Unterschied vorliegt, als bei Verwendung von Mazerationssäften die wasserstoffabfangende Wirkung des Mediums kräftiger ist, wodurch das gebildete Acetylmethylcarbinol selbst vor der reduzierenden Wirkung geschützt und also nicht in Butylenglykol übergeführt wird.

Weil wir geneigt waren, die wasserstoffabfangende Wirkung bei der Fructosevergärung einem aus der Fructose gebildeten Spaltungsprodukt zuzuschreiben, und es nicht ausgeschlossen schien, daß dieses Spaltungsprodukt Dioxyaceton sei, haben wir noch geprüft, ob vielleicht diese Substanz eine merkliche wasserstoffabfangende Wirkung ausübte. Das benutzte Dioxyaceton war auf biochemischem Wege (mittels *Acetobacter suboxydans*) aus Glycerin dargestellt und zeigte einen Schmelzpunkt 78 bis 80° C. Das Resultat war jedoch durchaus negativ (Versuch 27). Wohl zeigte sich, daß unser Saft C dem Dioxyaceton gegenüber eine ziemlich kräftige Gärwirkung entfaltete (Versuch 28). Nach 3 Stunden waren schon etwa 30 Proz. des hinzugefügten Dioxyacetons vergoren (Versuche im quantitativen Vergärungsapparat nach *van Iterson-Kluyver*). In 14 Stunden war dieser Betrag auf mehr als 75 Proz. gestiegen.

Sehr bemerkenswert sind weiter die Versuche, um in der zellfreien Gärung eine Bildung von Acetylmethylcarbinol oder Butylenglykol aus Glucose durch eine kräftige Aeration zu erzwingen. Die mehrfach wiederholten Versuche hatten ein negatives Ergebnis (Versuch 30), was im Gegensatz steht mit den Resultaten der Versuche, wo lebende Hefe statt Mazerationssaft benutzt worden ist. Die Erklärung wird darin gelegen haben, daß bei den Versuchen mit Mazerationssaft der direkte Kontakt des dehydrierenden Agens mit einem so vorzüglichen Wasserstoffakzeptor, wie der Luftsauerstoff, der intermediär gebildete

Acetaldehyd weiter zu Essigsäure und schließlich zu Kohlensäure und Wasser dehydriert wird, infolgedessen die Acetylmethylcarbinolkondensation nicht eintritt.

C. Versuche mit wachsenden Hefereinkulturen unter normalen Bedingungen.

Die direkte Veranlassung zu diesen Versuchen war eine Untersuchung, die einer von uns (*Visser 't Hooft*) angestellt hatte zur Aufklärung des Stoffwechsels verschiedener Essigbakterienarten. Dabei wurde unter anderem die Aufmerksamkeit auf das von verschiedenen Forschern nachgewiesene regelmäßige Vorkommen von Acetylmethylcarbinol in verschiedenen Essigarten gelenkt. Es wurde versucht, eine Erklärung für die Entstehungsweise des Acetylmethylcarbinols zu geben, welche bis jetzt noch ziemlich im Dunkeln geblieben war.

Es stellte sich nun heraus, daß das Acetylmethylcarbinol in einigermaßen beträchtlichen Mengen nur in den Essigarten vorkommt, welche *direkt* aus vergorenen Zuckerlösungen durch biochemische Oxydation unter dem Einfluß der Essigbakterien hergestellt sind[1]). Es lag auf der Hand, anzunehmen, daß das Acetylmethylcarbinol unter diesen Umständen seinen Ursprung der Anwesenheit von 2, 3-Butylenglykol in den für die Essigbereitung dienenden vergorenen Zuckerlösungen verdankte, indem die Essigbakterien das 2, 3-Butylenglykol zu Acetylmethylcarbinol oxydierten.

Daß die Essigbakterien zu dieser biochemischen Oxydation befähigt sind, wurde durch Reinkulturversuche bewiesen. Die Vermutung, daß die Essigmaischen in den Fällen, wo der fertige Essig Acetylmethylcarbinol enthielt, einen Gehalt an 2, 3-Butylenglykol aufweisen würden, ließ sich nun ebenfalls bestätigen. So zeigte sich, daß vergorener Rosinenextrakt — Ausgangsmaterial für den in Holland vielfach dargestellten Rosinenessig — und junger Wein merkliche Mengen Butylenglykol enthielten (man vgl. Tabelle C, Versuche 49 und 50). Unvergorener Rosinenextrakt verhielt sich negativ (Versuch 48).

Bei der alkoholischen Vergärung des Rosinen- und Traubensaftes bildet sich also 2, 3-Butylenglykol. Auf Grund der im vorhergehenden beschriebenen Versuche glaubten wir, dies nun anfangs dem Fructosegehalt dieser Säfte zuschreiben zu müssen. Um dies näher zu bestätigen, entschlossen wir uns, glucose- bzw. fructosehaltige Nährlösungen nach Sterilisation mit einer Spur Hefenreinkultur zu impfen und diese Flüssigkeiten nach Beendigung der Hefenentwicklung auf 2, 3-Butylenglykol zu prüfen. Die verwendete Reinkultur war aus Delfter Preßhefe („Koningsgist" der „Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek") auf die übliche Weise isoliert.

[1]) Näheres hierüber bei *F. Visser 't Hooft*, Chem. Weekblad **22**, 272, 1925.

Tabelle C.

Versuche mit wachsenden Hefereinkulturen unter normalen Bedingungen.

Bei allen Versuchen wurden 30 ccm einer Kulturflüssigkeit von der in der Tabelle angegebenen Zusammensetzung benutzt. Eventuell wurde mit einer Reinkultur von *Saccharomyces cerevisiae* geimpft. Die benutzten Hefenextrakte zeigten etwa 2° Blg. Versuchstemperatur 30° C.

Nr.	Benutztes Kulturmedium	Impfung	Versuchsdauer Tage	Acetylmethylcarbinol	2, 3-Butylenglykol
31	Hefenextrakt A	Nein	—	—	—
32	Hefenextrakt A	Ja	3	—	—
33	Hefenextrakt A	„	7	—	—
34	Hefenextrakt A + 5 Proz. Glucose .	„	3	—	Spur
35	Hefenextrakt A + 5 Proz. Glucose .	„	7	—	Spur
36	Hefenextrakt A + 5 Proz. Fructose .	„	3	—	+
37	Hefenextrakt A + 5 Proz. Fructose .	„	7	—	+
38	Hefenextrakt A + 10 Proz. Glucose .	„	3	—	++
39	Hefenextrakt A + 10 Proz. Glucose .	„	7	—	++
40	Hefenextrakt A + 10 Proz. Fructose	„	3	—	+++
41	Hefenextrakt A + 10 Proz. Fructose	„	7	—	+++
42	Hefenextrakt B	Nein	—	—	—
43	Hefenextrakt B + 5 Proz. Alkohol .	„	—	—	—
44	Hefenextrakt B	Ja	3	—	+
45	Hefenextrakt B + 10 Proz. Glucose .	„	3	—	++
46	Hefenextrakt B + 5 Proz. Glucose + 5 Proz. Fructose	„	3	—	++
47	Hefenextrakt B + 10 Proz. Fructose	„	3	—	++
48	Rosinenextrakt	Nein	—	—	—
49	Rosinenextrakt	Ja	3	—	++
50	1924er Bordeauxwein	Nein	—	—	Spur
51	Mineralische Nährlösung[1]) + 10 Proz. Glucose	Ja	3	+	—
52	Mineralische Nährlösung + 10 Proz. Glucose	„	14	+	++
53	Mineralische Nährlösung + 10 Proz. Fructose	„	3	+	Spur
54	Mineralische Nährlösung + 10 Proz. Fructose	„	14	+	++

[1]) Die mineralische Nährlösung enthielt: 0,1 Proz. $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 Proz. KH_2PO_4, 0,1 Proz. $MgSO_4$ und 0,05 Proz. $FeCl_3$ in Leitungswasser gelöst; außerdem zu 100 ccm 8 Tropfen Hefenextrakt.

Für die Herstellung des bei den ersten Versuchen als Nährflüssigkeit verwendeten Hefenextraktes benutzten wir eine Preßhefe, die wir zuvor mit gutem Erfolg auf die Abwesenheit von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol untersucht hatten. Zum Überfluß überzeugten wir uns noch, daß auch der fertige Extrakt keine Carbinol- oder Butylenreaktion zeigte (Versuche 31 und 42), auch nicht, wenn 5proz. Alkohol vor der Prüfung zugefügt wurde[1]) (Versuch 43).

[1]) Es war nämlich denkbar, daß bei der Ausführung der *Lemoigne*schen Reaktionen aus Alkohol primär Acetaldehyd und hieraus Acetylmethylcarbinol gebildet wurde.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle C, Versuche 34 bis 47, wiedergegeben. Wie hieraus ersichtlich ist, tritt sowohl beim Hefenwachstum in glucose- wie in fructosehaltenden Nährlösungen Butylenglykolbildung ein, welche offenbar durch größere Zuckerkonzentrationen gefördert wird. Ausdehnung der Versuchsdauer von 3 Tagen, nach welcher Frist der Zucker größtenteils, aber nicht vollständig verschwunden war, bis auf 7 Tage brachte keine merkliche Änderung in den Quantitäten des gebildeten 2, 3-Butylenglykols. Während in einzelnen Versuchen die Fructose etwas höhere Ausbeuten ergab als die Glucose, waren in anderen Fällen diese Quantitäten ziemlich gleich.

Wir wiederholten diese Versuche noch in der Weise, daß statt des Hefenextraktes eine mineralische Nährlösung[1]) verwendet wurde (Versuche 51 bis 54). Das Wachstum war viel weniger üppig als bei Benutzung von Hefenextrakt als Nährlösung. Dies brachte mit sich, daß nach 3 Tagen noch eine große Menge Zucker unverbraucht vorhanden war, weshalb die Versuche auf 14 Tage ausgedehnt wurden. Auch dann aber war der Zucker noch nicht gänzlich verbraucht. Im Gegensatz zu den Wachstumsversuchen in Hefenextrakt war immer eine Menge Acetylmethylcarbinol nicht zu 2, 3-Butylenglykol reduziert.

Aber auch hier stellten wir fest, daß Glucose und Fructose sich annähernd gleichartig verhielten. Hier schien ein Widerspruch vorzuliegen mit den in den Abschnitten A und B beschriebenen Ergebnissen, wo wir immer fanden, daß Fructose für die Butylenglykolbildung viel mehr geeignet war als die Glucose.

Wir dürfen hieraus schließen, daß die Wachstumsvorgänge ebenfalls zu der Bildung von Acetylmethylcarbinol bzw. 2, 3-Butylenglykol Anlaß geben.

Es ist nun durchaus wahrscheinlich, daß diese Sachlage eng verknüpft ist mit der bekannten Tatsache, daß die Alkoholhefe nicht zu einer vollständig anaeroben Lebensweise befähigt ist. Für das Wachstum der Hefe ist, wie *Pasteurs* Schüler *Cochin* schon 1880 nachwies und allen Praktikern der Gärungsbetriebe geläufig ist, eine gewisse Quantität Sauerstoff durchaus unentbehrlich. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden unsere Wachstumsversuche alle in nur mit Watteverschluß versehenen Kölbchen ausgeführt. Der Sauerstoff hatte hier also Gelegenheit, in das Spiel der Reaktionen einzugreifen und seine wasserstoffakzeptierende Wirkung zu entfalten. Notwendigerweise muß dies aber zu einem Überschuß eines anderen Wasserstoffakzeptors führen, wobei an erster Stelle an Acetaldehyd zu denken ist.

Je langsamer das Wachstum vor sich geht, desto kräftiger wird der Sauerstoff seinen Einfluß in dieser Hinsicht ausüben können. Es

[1]) Unter Zufügung von einigen Tropfen Hefenextrakt als „Bios"-Zusatz.

kann uns also nicht wundern, daß bei den Versuchen mit mineralischen Nährlösungen die Wachstumsverzögerung auch zur Folge hat, daß ein Teil des Acetylmethylcarbinols vor einer Reduktion zu 2, 3-Butylenglykol geschützt wird.

Zu erwähnen bleibt noch, daß bisweilen auch Impfung eines Hefenextraktes ohne Zuckerzusatz, wobei immer noch eine geringe Hefenentwicklung eintritt, zu Butylenglykolbildung führt, wenn auch die gebildete Menge sehr zurücksteht (Versuch 44). Dies wird zweifellos damit zusammenhängen, daß der Hefenextrakt in diesem Falle noch Kohlenhydrate (Glykogen ?) enthielt.

IV. Über die Beziehungen des Sauerstoffs zu der alkoholischen Gärung.

Die in den vorhergehenden Abschnitten mitgeteilten Versuchsergebnisse sind durchaus geeignet, einen neuen Einblick in die Beziehungen des Sauerstoffs zu der alkoholischen Zuckervergärung zu eröffnen.

Denn es hat sich einerseits gezeigt, daß das Eingreifen des Sauerstoffs in den Komplex der Teilreaktionen, welchen man als alkoholische Gärung zu bezeichnen pflegt, darin besteht, daß der Sauerstoff den normalerweise bei der Methylglyoxaldehydrierung als Wasserstoffakzeptor auftretenden Acetaldehyd verdrängt. Andererseits ist deutlich hervorgetreten, daß die Wirkung des Sauerstoffs sich in erster Instanz durchaus nicht unterscheidet von dem Einfluß, den andere geeignete Wasserstoffakzeptoren in dieser Hinsicht ausüben.

Diese Anschauungsweise hat den Vorzug, daß sie den normalen Gärungsvorgang aufs engste verknüpft mit den oxydativen Leistungen der Hefe, worüber in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren ausführlich berichtet worden ist [*Fürth* und *Lieben*[1]), *Lieben*[2]), *Lundin*[3]), *Myrbäck* und *Everitt*[4])]. Genau wie der Luftsauerstoff die verschiedensten Substanzen, z. B. Milchsäure, Brenztraubensäure, Alkohol und andere, zu dehydrieren imstande ist, wird er auch bei der Zuckervergärung in die erste Teilreaktion eingreifen, welche auf einer intermolekularen Dehydrierung und Hydrierung beruht.

Nur könnte es wundern, daß die Einwirkung des Luftsauerstoffs, welcher doch ein so vorzüglicher Wasserstoffakzeptor ist, relativ so wenig in den Vordergrund tritt. Wir möchten hierzu bemerken, daß es sich beim Eingreifen des Sauerstoffs in den Gärungsvorgang also

---

[1]) *O. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **128**, 144, 1922; **132**, 165, 1922.

[2]) *F. Lieben*, ebendaselbst **135**, 240, 1923.

[3]) *H. Lundin*, ebendaselbst **141**, 310, 1923; **141**, 342, 1923; **142**, 454, 1923; **142**, 463, 1923.

[4]) *K. Myrbäck* und *B. Everitt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 272, 1924.

immer um einen Konkurrenzkampf des an Ort und Stelle der Dehydrierung anwesenden Acetaldehyds und des langsam in gelöster Form und daher in niedriger Konzentration in die Zelle hineindiffundierenden Sauerstoffs handelt. Dazu kommt dann noch, daß dieser Diffusionsvorgang zweifellos von der aus der Zelle entweichenden Kohlensäure erschwert wird.

Unter diesen Umständen leuchtet es ein, daß eine intensive Aeration unbedingt erforderlich ist, um eine größere wasserstoffabfangende Wirkung des Sauerstoffs zu erzwingen. Weil der energetische Effekt einer Wasserstoffübertragung auf freien Sauerstoff viel größer ist als eine solche auf Acetaldehyd und der energetische Effekt der Dissimilationsprozesse an erster Stelle die Wachstumsintensität der Hefe bedingt, wird es auch begreiflich, warum die moderne Lufthefenfabrikation zu immer kräftigerer Aeration ihre Zuflucht genommen hat.

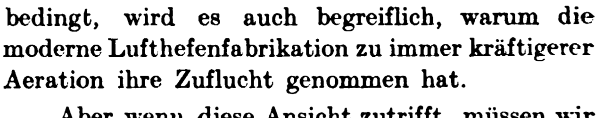
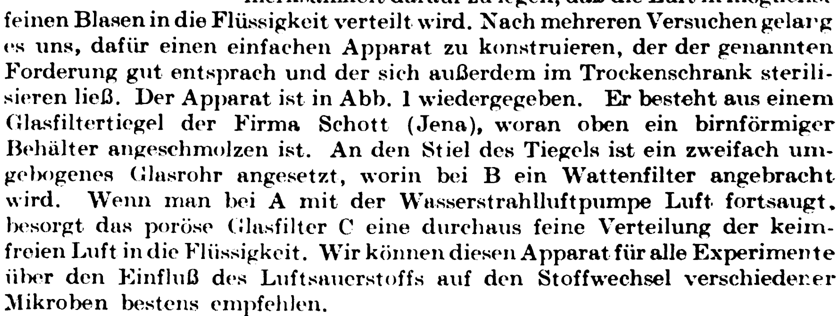


Abb. 1.

Aber wenn diese Ansicht zutrifft, müssen wir auch folgern, daß eben unter den Bedingungen der Lufthefenfabrikation eine sehr ausgesprochene Bildung von Acetylmethylcarbinol auftreten wird.



Um dies zu prüfen, wurde eine sterile Würze (von etwa 5° Blg.) mit einer relativ kleinen Menge einer Hefenreinkultur geimpft und nun unter fortwährender Durchleitung von mittels Wattenfilter keimfrei gemachter Luft im Brutschrank bei 28 bis 30° C gehalten. Es zeigte sich notwendig, große Aufmerksamkeit darauf zu legen, daß die Luft in möglichst feinen Blasen in die Flüssigkeit verteilt wird. Nach mehreren Versuchen gelang es uns, dafür einen einfachen Apparat zu konstruieren, der der genannten Forderung gut entsprach und der sich außerdem im Trockenschrank sterilisieren ließ. Der Apparat ist in Abb. 1 wiedergegeben. Er besteht aus einem Glasfiltertiegel der Firma Schott (Jena), woran oben ein birnförmiger Behälter angeschmolzen ist. An den Stiel des Tiegels ist ein zweifach umgebogenes Glasrohr angesetzt, worin bei B ein Wattenfilter angebracht wird. Wenn man bei A mit der Wasserstrahlluftpumpe Luft fortsaugt, besorgt das poröse Glasfilter C eine durchaus feine Verteilung der keimfreien Luft in die Flüssigkeit. Wir können diesen Apparat für alle Experimente über den Einfluß des Luftsauerstoffs auf den Stoffwechsel verschiedener Mikroben bestens empfehlen.

Wenn wir nun in diesem Apparate unter den genannten Bedingungen Lufthefe bereiteten, erhielten wir nach Verlauf von 10 Stunden eine durchaus kräftige Acetylmethylcarbinolbildung. Nicht immer, doch wohl in einzelnen Fällen, konnte daneben auch Bildung von 2, 3-Butylenglykol festgestellt werden.

Inwieweit das Acetylmethylcarbinol zu 2, 3-Butylenglykol reduziert wurde, zeigte sich nun als abhängig von der Konzentration der Hefe und von der Intensität der Lüftung, und zwar bedingt eine hohe

Hefenkonzentration eine relativ schlechte Lüftung der einzelnen Hefenzellen, wodurch auch das Acetylmethylcarbinol als Wasserstoffakzeptor auftreten und dabei in 2, 3-Butylenglykol übergeführt wird. Findet dagegen kräftige Lüftung bei nicht zu großer Hefenkonzentration statt, so wird das Acetylmethylcarbinol von dem Sauerstoff vor der Reduktion geschützt.

Wir möchten an dieser Stelle darauf hinweisen, daß neulich eine Abhandlung von *Balls* und *Brown*[1]) erschienen ist, worin unter anderem Meldung gemacht wird von dem Auftreten einer die *Fehling*sche Lösung reduzierenden unvergärbaren Substanz bei der alkoholischen Zuckervergärung unter kräftiger Lüftung. Es wird wohl keinem Zweifel unterliegen, daß diese Substanz das Acetylmethylcarbinol gewesen ist.

Inzwischen stellte sich bei unseren Versuchen heraus, daß die Mengen des Acetylmethylcarbinols und 2, 3-Butylenglykols zu gering sind, um den bekanntlich infolge der Lüftung auftretenden sehr bedeutenden Rückgang in der Alkoholproduktion zu erklären. Es ist also deutlich, daß ein Teil des vor der Hydrierung zu Alkohol geschützten Aldehyds anderen Umsetzungen anheimgefallen ist. Es ist wohl anzunehmen, daß dieser Teil des Acetaldehyds selbst *de*hydriert ist, wobei der Sauerstoff als Akzeptor fungiert hat, oder daß nach der üblichen Auffassung der Acetaldehyd oxydiert worden ist. Das erste Produkt dieser Dehydrierung wird zweifellos die Essigsäure sein und wir möchten in diesem Zusammenhang an die Tatsache erinnern, daß eine geringe Säuerung der Maische im Lufthefenbetrieb immer wahrnehmbar ist.

Man könnte geneigt sein, auf Grund der von *Lieben*[2]) erhaltenen Resultate die oxydative Verarbeitung des Acetaldehyds in Abrede zu stellen. Wir sind jedoch im Gegenteil der Meinung, daß die von diesem Autor sichergestellte oxydative Verarbeitung der Brenztraubensäure durch Hefe auch für die oxydative Verarbeitung des Acetaldehyds beweisend ist. Daß *Lieben* selber bei seinen Experimenten bezüglich der direkten oxydativen Verarbeitung des Acetaldehyds ein negatives Ergebnis erhielt, wird seine Erklärung darin finden, daß er für seine Versuche eine Lösung von Acetaldehyd und Natriumcarbonat verwendete, wobei der Aldehyd zweifellos einer Aldolkondensation unterlegen ist. Dieser Schluß ist wohl darum berechtigt, weil *Lieben* selber mitteilt, daß der Acetaldehyd sogar nach 10 Stunden kräftiger Sauerstoffdurchleitung unter Schütteln nicht nennenswert in die Vorlagen übergeht.

Schließlich wollen wir nur noch erwähnen, daß wir Gelegenheit hatten, die Richtigkeit unserer Ergebnisse an den ausgegorenen Maischen

---

[1]) *A. K. Balls* and *J. B. Brown*, Journ. of biol. Chem. **62**, 769, 1925.
[2]) *F. Lieben*, diese Zeitschr. **135**, 140, 1923.

einer Lufthefen- und Wienerhefenfabrik zu prüfen. Die Maischen der Lufthefenfabrik zeichneten sich durch einen sehr großen Acetylmethylcarbinolgehalt neben einem ebenfalls noch bedeutenden 2, 3-Butylenglykolgehalt aus. Die Maische der Wienerhefenfabrik enthielt nur 2, 3-Butylenglykol, keine Spur Acetylmethylcarbinol konnte nachgewiesen werden.

Zusammenfassung.

1. Die *Lemoigne*sche Methode zum Nachweis von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol wurde brauchbar gemacht auch für die Fälle, wo geringe Mengen der genannten Substanzen neben vielen Verunreinigungen vorliegen.

2. Es wurde gezeigt, daß Zufügung von geeigneten Wasserstoffakzeptoren zu gärenden Glucoselösungen zur Bildung von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol aus angehäuftem Acetaldehyd führt.

3. Die bei der Fructosevergärung auftretenden Spaltungsprodukte zeigen ebenfalls Wasserstoffakzeptorwirkung und bedingen also auch das Entstehen von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol bei der normalen Vergärung dieses Zuckers.

4. Die Änderungen, welche infolge einer Lüftung einer gärenden Zuckerlösung in dem Chemismus des Zuckerabbaues auftreten, lassen sich ebenfalls auf die wasserstoffakzeptierende Wirkung des Sauerstoffs zurückführen. In erster Linie wird die Lüftung also wieder zum Entstehen von Acetylmethylcarbinol und 2, 3-Butylenglykol Anlaß geben. Bei kräftigster Aeration, wie diese in der Lufthefenfabrikation üblich ist, wird wahrscheinlich ein wichtiger Teil des Acetaldehyds auch einer oxydativen Verarbeitung unterliegen.

5. Die gegebenen Ausführungen bahnen ein näheres Verständnis der sich in der Lufthefenfabrikation abspielenden chemischen Vorgänge an.

Phytobiochemische Studien. II.

Von

As. Zlataroff.

(Aus dem chemischen Institut der Universität zu Sofia.)

(Eingegangen am 16. Juni 1925.)

Die vorliegende Arbeit bildet die Fortsetzung und den Abschluß meiner bromatologischen und biochemischen Untersuchungen der Kichererbsenfrüchte (Cicer arietinum L.)[1]) und enthält die Ergebnisse der systematischen Erforschung der phosphorhaltigen Lipoide aus Kichererbsenphosphatiden. Es ist gelungen, die Natur einiger Pflanzenphosphatide festzustellen.

Zwei parallele, nach der Methode von *Schulze* ausgeführte Analysen der Kichererbsenproben lieferten folgende Werte für den Prozentgehalt an Lecithin:

Tabelle I.

Probe g	$Mg_2P_2O_7$ g	P_2O_5 g	P_2O_5 g
10	0,021 28	0,0139	0,139
10	0,022 70	0,0145	0,145

Die P_2O_5-Menge (durchschnittlich 0,142 g) mit dem Faktor 11,36 multipliziert, ergibt einen Gehalt von 1,61 Proz. (mit 10 Proz. Naturwassergehalt) Lecithin in den Kichererbsen oder — auf trockene Substanz berechnet — 1,76 Proz.

Untersuchung der Kichererbsenphosphatide.

In einem Extraktor, der 7 kg Kichererbsenmehl faßt, extrahierte ich nacheinander etwa 70 kg dieses Mehles. Jede einzelne Extraktion dauerte 5 Tage. Das gewonnene orangegelbe Öl wurde unter fortgesetztem Rühren in feinem Strahl in 10 Liter reinen Acetons einfließen gelassen. Es resultierte eine schwere, cremefarbige Masse, die auf dem Boden des Gefäßes rasch gerann. Das in Aceton gelöste Öl wurde durch Dekantieren entfernt; der Niederschlag wurde mit reinem

[1]) Vgl. Phytobiochemische Studien I, diese Zeitschr. **123**, 200, 1916.

Aceton ausgewaschen, schnell filtriert, auf dem Filter zwecks Entfernung des Acetons abgepreßt und in absolutem, über Natrium destilliertem Äther gelöst. Die Lösung wurde einige Stunden bis zur Gerinnung stehengelassen, wobei stets kleine Mengen Stärke bei der Extraktion abgeschwemmt wurden und in das Öl gerieten, und die klare Lösung dekantiert. Nach Entfernung des Äthers blieb eine stärkekleisterartige, gelb-durchsichtige Masse zurück, die in zugeschmolzenen, mit CO_2 gefüllten Glasröhrchen aufbewahrt wurde.

Die so gewonnene stärkekleisterartige Masse unterzog ich einer fraktionierten Trennung mittels absoluten Alkohols in folgender Weise: 70 g dieser Masse wurden mit 300 ccm absoluten Alkohols kalt bearbeitet. Darauf wird filtriert, das Filtrat verdunstet und der trockene Rückstand, der eine bleich-bernsteinfarbige Substanz darstellt, in zugeschmolzenen, mit CO_2 gefüllten Glasröhrchen aufbewahrt. Ausbeute etwa 48 g.

Die in kaltem, absolutem Alkohol nicht lösliche Fraktion behandelte ich mit heißem, absolutem Alkohol etwa 1 Stunde am Rückflußkühler. Die Filtration erfolgte im Heißwassertrichter. Der Alkohol wird verdunstet, und die restierende, bleichgelbe Masse, die leicht zu Staub zerrieben werden konnte, wurde in zugeschmolzenen, mit CO_2 gefüllten Glasröhrchen aufbewahrt. Ausbeute etwa 12 g.

Die übrige, in heißem, absolutem Alkohol unlösliche Fraktion von etwa 10 g wurde ebenfalls in einem zugeschmolzenen, mit CO_2 gefüllten Glasröhrchen aufbewahrt.

Auf diese Weise wurde der Acetonniederschlag der Phosphatide in drei Fraktionen zerlegt. Jede Fraktion sowie das aus der Acetonlösung gewonnene Öl wurde auf Phosphor analysiert. Die Verbrennung erfolgte mit konzentrierter HNO_3 und H_2SO_4 — nach der Methode von *Neumann* —, in dem erhaltenen Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat wurde die Phosphormenge nach der Methode von *Sattler* ermittelt. Die Analysen ergaben folgende Resultate:

Tabelle II.

Entnommene Probe von		g	Gefunden g P	Berechnet Proz. P
dem Öl aus dem Aceton	I	27,3830	0,0186	0,068
	II	29,9240	0,0188	0,063
dem ursprünglichen Acetonniederschlag	I	0,6982	0,0271	3,880
	II	0,7831	0,0302	3,860
dem in kaltem, absolutem Alkohol löslichen Teil	I	0,5968	0,0212	3,560
	II	0,6685	0,0185	3,480
dem in heißem, absolutem Alkohol löslichen Teil	I	0,8117	0,0321	3,960
	II	0,6233	0,0256	4,080
dem in heißem, absolutem Alkohol unlöslichen Teil	I	0,5589	0,0230	4,120
	II	0,4921	0,0209	4,240

Aus den Bestimmungen geht hervor, daß nicht alle Kichererbsenphosphatide in Aceton unlöslich sind. Aus der Menge des im Acetonextrakt des Kichererbsenöls gefundenen Phosphors ist ersichtlich, daß dieses Öl etwa 20 Proz. Phosphatide enthält, die in Aceton löslich sind, oder, wenn man auf Lecithin berechnet, so enthält das aus Aceton gewonnene Öl 1,8 Proz Lecithin, die 0,09 Proz. im Verhältnis zum Kichererbsenmehl entsprechen. Dieser Befund zeigt, daß die Behauptung, die Phosphatide seien in Aceton nicht löslich, unrichtig ist, und ist zugleich von Bedeutung für die Klassifikation der Phosphatide.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ersieht man ferner, daß mit der verminderten Löslichkeit der Phosphatide in absolutem Alkohol ihr Phosphorgehalt steigt: die in kaltem, absolutem Alkohol lösliche Fraktion weist 3,52 Proz. P auf, während der in heißem, absolutem Alkohol lösliche Teil 4,18 Proz. P enthält.

Systematische Untersuchung der in kaltem, absolutem Alkohol löslichen Fraktion der Phosphatide.

Die Klassifikation der Phosphatide bleibt immer noch äußerst unbestimmt, weil es an sicheren Methoden zur Einteilung der einzelnen Phosphatide fehlt, was besonders die Pflanzenphosphatide betrifft.

Entscheidende Fortschritte in dieser Richtung bringen die Untersuchungen über die Gruppe der Pflanzenphosphatide von *E. Schulze*, *E. Winterstein*, *O. Hiestand*, *G. Trier*.

Ich unternahm es, eine genaue Methode für die Einteilung der Kichererbsenphosphatide in einzelne Individuen — nicht in Gruppen — auszuarbeiten, und nach einigen ergebnislos verlaufenen Versuchen gelang mir eine bequeme und nicht besonders komplizierte Art und Weise der Einordnung, wenigstens für einen Teil der Pflanzenphosphatide in einzelne bestimmte Phosphatidgruppen, die von Bedeutung für die Erforschung der Zusammensetzung dieser Phosphatide sowie für ihre richtige Klassifikation ist.

Die Methodik besteht in folgendem:

Ich habe 45 g der in kaltem, absolutem Alkohol löslichen Phosphatide in 350 ccm Alkohol gelöst. Dieser Lösung fügte ich 150 ccm reinen, aus der Bisulfitverbindung gewonnenen Acetons hinzu. Der entstehende Niederschlag wurde filtriert und durch dreimaliges Auflösen in kaltem, absolutem Alkohol sowie Gerinnenlassen durch Aceton gereinigt. Die resultierende Substanz wurde in Wägefläschchen in einem mit CO_2 gefüllten Exsikkator aufbewahrt. Ausbeute etwa 20 g. Das ergibt die Fraktion A.

Aus der filtrierten Lösung des Alkoholacetons isolierte ich zwei weitere Fraktionen von Phosphatiden auf folgende Weise: Die Flüssigkeit wurde unter vermindertem Druck auf dem Wasserbade bei etwa

35° eingedampft, indem durch den Destillierkolben ein CO_2-Strom durchgeleitet wurde. Zuerst ging das Aceton über. Als die Alkohollösung im Kolben bis auf etwa 50 ccm konzentriert worden war, trat eine schwache Opaleszenz auf. Die Destillation wurde beendet und die Lösung 24 Stunden bei etwa 6° stehengelassen. Aus dieser konzentrierten Lösung schieden sich bleichgelbliche, nadelförmige kleine Kristalle aus, die rasch abfiltriert, auf Tonplatten gestrichen und in einen mit CO_2 gefüllten Exsikkator über Schwefelsäure gebracht wurden. Die Substanz wurde wiederholt aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Ausbeute etwa 10 g. Daraus ergab sich die Fraktion B.

Das Filtrat der kristallinischen Fraktion wurde im CO_2-Strom bis zur Trockne verdampft. Es wurde eine bleiche, bernsteinfarbige, hornartige Masse gewonnen, die durch zweimaliges Lösen in absolutem Alkohol und Gerinnenlassen mit Aceton gereinigt wurde. Ausbeute etwa 12 g. Fraktion C.

Die so erhaltenen Fraktionen A, B und C wurden analysiert. Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

Tabelle III.

Fraktionen		C Proz.	H Proz.	N Proz.	P Proz.
A	I	60,30	9,32	1,18	2,73
	II	60,54	9,16	1,28	2,99
B	I	65,80	10,06	1,64	3,90
	II	65,82	9,90	1,54	4,46
C	I	65,88	10,21	1,79	3,90
	II	65,62	10,39	1,87	4,06

Da die Substanzen hygroskopisch sind, fand das Abwägen in Wägefläschchen statt, in welche die Porzellanschiffchen ganz hineingebracht wurden.

Ich löste je 2 g von den Fraktionen A, B und C in absolutem Alkohol auf und fügte eine konzentrierte Lösung von $CdCl_2$ hinzu. Die entstandenen Niederschläge wurden aus Alkohol umkristallisiert, mit Alkohol und Aceton gut ausgewaschen und dann getrocknet. Sie lieferten bei der Elementaranalyse folgende Werte:

Tabelle IV.

Fraktion		C Proz.	H Proz.	N Proz.	P Proz.	Cd Proz.	Cl Proz.
A	I	51,36	7,90	1,10	2,67	9,11	5,81
	II	51,44	8,08	1,02	2,53	8,89	5,97
B	I	46,34	7,69	1,11	2,20	13,50	8,67
	II	46,24	7,51	0,91	2,60	13,54	8,53
C	I	48,64	7,70	1,43	3,00	15,60	9,90
	II	48,94	7,86	1,37	3,12	15,82	9,76

Nach Feststellung der Elementarzusammensetzung der drei Fraktionen wurden die Phosphatide folgenden Untersuchungen unterworfen:

Direkt erhitzt mit *Fehling*scher Lösung, reduzieren die Fraktionen A und C die Lösung nicht. Allein die Fraktion B gibt einen charakteristischen roten Niederschlag von Cu_2O.

Kocht man die Substanzen der Fraktionen A und C mit verdünnter Schwefelsäure, neutralisiert alsdann mit einer Base und wiederholt das Erhitzen mit *Fehling*scher Lösung, so gibt die Mischung der *Fehling*schen Lösung mit der Lösung der Fraktion A einen charakteristischen Niederschlag von Cu_2O.

Destilliert man die Substanz aus Fraktion A mit konzentrierter Salzsäure, so erweist sich im Destillat eine bedeutende Menge von Furfurol, dessen Vorhandensein auf folgende Weise festgestellt wird:

1. In Anilinacetat getränktes Papier färbt sich braunrot.

2. Wird die mit festem Na_2CO_3 neutralisierte Lösung des Destillats unter Erwärmen auf dem Wasserbad mit einigen Kubikzentimetern einer Mischung von 5 g Phenylhydrazin, 3 g Essigsäure und 100 g Wasser versetzt, so bilden sich kleine Kristalle des schwer löslichen Furfurolphenylhydrazons mit dem Schmelzpunkt 96⁰.

Der Versuch zeigt, daß hier ein Phosphatid vorliegt, das mit einem Pentosan verbunden ist.

Die Fraktion B weist einen süßen Geschmack auf.

Aus der Gesamtheit der analytischen und sonstigen Daten läßt sich feststellen, daß in den von uns gewonnenen drei Fraktionen mehrere gesonderte Phosphatide vorliegen, die in den Fraktionen A und B mit Kohlenhydraten verbunden sind.

Auf Grund der Analysen der drei Phosphatidfraktionen lassen sich folgende empirische Formeln annehmen.

Tabelle V.

Fraktion A.

Elemente	Gefunden Proz.	Berechnet für $C_{43}H_{80}NPO_9(C_5H_8O_4)_2$ Proz.
C	60,42	60,58
H	9,24	9,21
N	1,23	1,34
P	2,86	2,95
		$C_{43}H_{80}NPO_9(C_5H_8O_4)_2CdCl_2$
C	51,40	51,58
H	7,99	7,84
N	1,06	1,14
P	2,60	2,51
Cd	9,00	9,11
Cl	5,89	5,75

Tabelle VI.
Fraktion B.

Elemente	Gefunden Proz.	Berechnet für $C_{43}H_{80}NPO_9C_6H_{12}O_6$ Proz.
C	60,81	60,89
H	9,98	9,60
N	1,59	1,45
P	3,38	3,21
		$C_{43}O_{80}NPO_9C_6H_{12}O_6(CdCl_2)_{1,5}$
C	46,29	40,34
H	7,60	7,47
N	1,01	1,13
P	2,40	2,50
Cd	13,52	13,60
Cl	8,60	8,58

Tabelle VII.
Fraktion C.

Elemente	Gefunden Proz.	Berechnet für $C_{43}H_{80}NPO_9$ Proz.
C	65,75	65,68
H	10,30	10,26
N	1,83	1,78
P	3,50	3,95
		$(C_{43}H_{80}NPO_9)_2(CdCl_2)_3$
C	48,79	48,65
H	7,78	7,60
N	1,40	1,32
P	3,06	2,92
Cd	15,71	15,90
Cl	9,83	10,03

Das Phosphatid der Fraktion B ergibt, mit *Fehling*scher Lösung titriert, durchschnittlich bei zwei Bestimmungen 18,47 Proz. Glucose, während sich für $C_{43}H_{80}NPO_9(C_6H_{12}O_6)$ 18,65 Proz. berechnen.

Aus der Gesamtheit aller Analysenresultate erweist sich folgendes:

1. Die Fraktion A stellt ein Lecithinpentosan dar. Über derartige Verbindungen ist, soweit mir bekannt, bis jetzt in der biochemischen Literatur nicht berichtet worden.

2. Die Fraktion B stellt eine Lecithinglucose dar. Damit bestätigt sich die Annahme, daß das Lecithin in stöchiometrische Beziehungen zu den Zuckern treten kann.

3. Die Fraktion C stellt ein Lecithin mit der empirischen Formel $C_{43}H_{80}NPO_9$ dar. Dieses Lecithin gehört der Zusammensetzung nach auch zu den komplexen Phosphatiden der Fraktionen A und B.

Um die Frage zu entscheiden, ob die drei Phosphatidfraktionen A, B und C in ihrem Molekül ungesättigte Fettsäuren enthalten, nahm ich die Bestimmung der Jodzahl derselben vor.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind:

Fraktion A:

I	32,50	nach *Hübl*
II	30,50	„ „

Fraktion B:

I	36,60	nach *Hübl*
II	37,20	„ „

Fraktion C:

I	40,20	nach *Hübl*
II	40,50	„ „

Dieselben Phosphatide, während 30 Tage der Wirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt, nehmen eine dunkle Farbe an und ergeben folgende Jodzahlen[1]):

Fraktion A:

I	14,26	nach *Hübl*
II	16,60	„ „

Fraktion B:

I	22,10	nach *Hübl*
II	21,60	„ „

Diese Daten zeigen, daß die in Frage kommenden Phosphatide bei Luftzutritt oxydiert werden und daß sich ihre Jodzahl vermindert.

III. Untersuchung der zum Molekül der Kichererbsenphosphatide gehörenden Basen.

Bei einigen früheren von mir vorgenommenen Untersuchungen wurden Kichererbsenphosphatide mit $Ba(OH)_2$ hydrolysiert und die isolierte Base als Platin- und Goldsalz analysiert:

Gefunden	3087	Proz.	Pt
Berechnet für $(C_5H_{14}NOCl)_2PtCl_4$	31,61	„	Pt
Gefunden	43,81	„	Au
Berechnet für $C_5H_{14}NOClAuCl_3$	44,99	„	Au

Diese Zahlen lieferten keine bestimmte Angabe über die zum Molekül der Kichererbsenphosphatide gehörende Base.

Um sicherere Resultate zu erhalten, unterwarf ich die ursprüngliche Substanz der Kichererbsenphosphatide einer Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure (2proz.), die nach den Angaben einiger Forscher nicht so stark wie die Alkalien auf die organischen Basen einwirken soll.

Die Hydrolyse wurde folgendermaßen vorgenommen: 50 g der Phosphatide wurden in einem Kolben am Rückflußkühler während

[1]) Der Stoff von der Fraktion C wurde erschöpft, so daß die zweite Bestimmung nicht stattfinden konnte.

etwa 12 Stunden mit 200 ccm 2proz. Schwefelsäure erhitzt. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt engte ich die neutrale klare Lösung auf dem Wasserbad bis auf 100 ccm ein. Der so gewonnenen konzentrierten Lösung fügte ich nach der Methode von *Wl. Gulewitsch*[1]) eine 50proz. Lösung von Phosphorwolframsäure hinzu. Nach 2 Tagen filtrierte ich den Niederschlag ab und wusch ihn mit Wasser aus. Dann zersetzte ich denselben mit kristallisiertem Bariumhydroxyd unter Zusatz von Wasser. Die Masse wird filtriert, wobei das klare Filtrat von überschüssigem Baryt durch Einleiten eines starken CO_2-Stromes befreit wird. Nach nochmaligem Filtrieren wird das klare Filtrat, das alkalische Reaktion aufweist, mit HNO_3 neutralisiert. An einzelnen Proben der so erhaltenen Lösung wurde nach der Methode von *Gulewitsch* und *Kossel* ermittelt, ob mit $AgNO_3$ und $Ba(OH)_2$ ein Niederschlag gebildet wird. Die Prüfung verlief negativ, was darauf hindeutet, daß in der Lösung keine Purinkörper, wie Methylguanidin und ähnliche Basen vorhanden sind.

Alsdann wurde der Lösung eine konzentrierte Lösung von *Krauts* Reagens hinzugefügt: Wismutkaliumjodid (Wismutjodid und Kaliumjodid), das einen reichlichen dunkelbraunen Niederschlag hervorrief. Jod und Wismut werden entfernt, wenn man den Niederschlag im Mörser mit einer größeren Menge frisch gefällten Bleihydrats verreibt. Nach längerem Verreiben (etwa 2 Stunden) nimmt der Niederschlag eine hellere Farbe an und wird schließlich cremegelb. Er wird an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Durch das klare Filtrat wird ein Strom von H_2S zur Entfernung der Bleispuren geleitet. Nach erneutem Filtrieren läßt man die Masse auf dem Wasserbad verdunsten. Die konzentrierte Lösung scheidet beim Abkühlen Kristalle aus, die abfiltriert und wieder in Alkohol gelöst werden. Da durch Einengen dieser Lösung keine Kristallisation erreicht werden konnte, wurde der Alkohol auf dem Wasserbad vollkommen abgedampft und der Trockenrückstand in warmem Wasser gelöst. Die Lösung wurde konzentriert und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehengelassen. Nach 4 Tagen schieden sich schöne farblose, flache, kleine Kristalle aus, die ich wieder umkristallisierte. Ausbeute 5,75 g.

Die ausführliche systematische Analyse ergab, daß die erhaltene Verbindung Betain war.

1. Bestimmung des Kristallwassers. Auf porösem Ton getrocknete und abgewogene Proben wurden in den Vakuumexsikkator über H_2SO_4 gebracht und innen im Gefäß mit Hilfe eines elektrischen Wärmers

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 565; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **33**, 1902; Zeitschr. f. Chem. **47**, 471; **45**, 326; **68**, 26; **80**, 218.

bis auf 45° erwärmt. Nach sechstägigem Trocknen wurde Gewichtskonstanz erreicht.

Gefunden: I	13,78 Proz.	H_2O
II	13,83 „	H_2O
Berechnet für $C_5H_{11}NO_2H_2O$	14,33 „	H_2O

Der Unterschied zwischen dem theoretisch berechneten und dem bei der Analyse ermittelten Prozentgehalt Kristallwasser läßt sich angesichts des Umstandes, daß das Betain hygroskopisch ist, leicht erklären[1]).

Die gewonnene trockene Substanz (Betain) wurde der Elementaranalyse unterworfen, die folgende Werte ergab:

Gefunden: I	51,00 Proz.	C	9,61 Proz.	H
II	51,04 „	C	9,79 „	H
Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$	51,24 „	C	9,47 „	H

2. *Das Chlorhydrat der Base.* Der wässerigen Lösung der Base wird Salzsäure bis zur sauren Reaktion zugefügt, dann wird die Lösung auf dem Wasserbad eingeengt und im Vakuumexsikkator auskristallisieren gelassen. Nach einigen Tagen erhielt ich eine schöne kristallinische Masse, die sich durch zweimaliges Umkristallisieren aus Wasser reinigen läßt. Die Analyse der Substanz ergab:

Gefunden: I	8,84 Proz.	N
II	8,72 „	N
Berechnet für $C_5H_{12}NO_2Cl$	9,12 „	N
Gefunden	23,09 „	Cl
Berechnet für $C_5H_{12}NO_2Cl$	23,40 „	Cl

Das Chlorhydrat der Base gibt schwer lösliche Doppelsalze mit den Schwermetallen, mit Pikrinsäure[2]) bilden sich nadelförmige, gelbe kleine Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 181° C.

3. *Golddoppelsalz.* Ich löste 0,8200 g der Substanz in 3 ccm Wasser auf, fügte der Lösung eine konzentrierte Lösung von $AuCl_3$ hinzu und erhielt einen kristallinischen, gelben Niederschlag, der abfiltriert und durch Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt wurde. Ausbeute 0,7960 g. Das Doppelsalz wies keinen festen Schmelzpunkt auf; wurde das Kapillarrohr schnell erhitzt, so schmolz das Salz gegen 211,5°, bei langsamem Erwärmen bei 204°. Die Analyse des Goldgehalts in dieser Verbindung ergab folgendes:

Gefunden: I	42,48 Proz.	Au
II	42,56 „	Au
Berechnet für $C_5H_{12}NO_2AuCl_4$	43,10 „	Au

[1]) *Scheiber*, Ber. d. deutch. chem. Ges. **3**, 156.
[2]) *Sonani*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**, 390.

In bezug auf den Schmelzpunkt des Golddoppelsalzes des Betains sowie auf seinen Goldgehalt existieren in der einschlägigen Literatur verschiedene Angaben: *L. Brieger*[1]) bestimmt als Schmelzpunkt 209° und 43,01 Proz. Au, während *E. Fischer*[2]) 230 bis 235° und 43,01 Proz. Au angibt. Beim Schmelzen zersetzt sich die Substanz unter Entwicklung von Gasen.

Eine Erklärung dieser widersprechenden Befunde gab *R. Willstätter*[3]). Dieser Autor fand, daß es zwei kristallinische Modifikationen dieses Doppelsalzes gibt: eine rhombische mit dem Schmelzpunkt 230 bis 235° und eine oktaedrische mit dem Schmelzpunkt 200 bis 209°. Ebenso verschieden sei auch der Goldgehalt in den beiden Modifikationen: die rhombische enthalte 43,1 Proz. Au, während die oktaedrische um einige Prozent ärmer sei. Nach *Willstätter* hat die oktaedrische Modifikation folgende Zusammensetzung: $C_5H_{12}NO_2AuCl_4\,2H_2O$. Er hat ein Doppelsalz mit 40,01 und sogar mit 39,75 Proz. Au erhalten.

Der von mir nach den Angaben *Willstätters* vorgenommene Versuch ergab, daß die Gewinnung der beiden Modifikationen des Gold-Betaindoppelsalzes leicht vor sich geht: 0,32 g des Doppelsalzes mischte ich mit 0,008 g $AuCl_3$ und löste die Mischung in 6 ccm siedenden Wassers auf. Beim Erkalten der Lösung schieden sich kleine Kristalle aus, die abfiltriert, mit einigen Tropfen Wasser ausgewaschen und zuerst im Vakuumexsikkator über H_2SO_4 getrocknet, dann auf poröse Tonplatten gestrichen und schließlich im Trockenschrank bei 105° getrocknet wurden. Die Verbrennung von 0,2026 g Substanz lieferte 0,0911 g Au = 42,84 Proz. Au. Der Schmelzpunkt, bei dem sich die Substanz zersetzt, lag bei 246 bis 248°.

4. *Platindoppelsalz.* Auf dieselbe Weise wie das Golddoppelsalz gewann ich auch das Platindoppelsalz mit $PtCl_4$, das folgenden Prozentgehalt für Pt ergab:

0,1203 g verbrannte Substanz gibt . .	0,0366 g	Pt
Gefunden	30,48 Proz.	Pt
Berechnet für $(C_5H_{12}NO_2Cl)_2PtCl_4$ . .	30,39 „	Pt

5. *Quecksilberdoppelsalz.* In der Literatur bestehen zwei Arten von Doppelsalzen des Betains mit Quecksilberchlorid: $C_5H_{11}NO_2HCl_2HgCl_2$[1]) und $(C_5H_{11}NO_2HCl)_2HgCl_2$. Ersteres ist schwer löslich in Wasser und Alkohol und hat einen Schmelzpunkt gegen 250°. Letzteres, von *Husemann* und *Marme* erhalten, ist äußerst leicht in Wasser und Alkohol löslich und wird aus der Lösung des Betainchlorhydrats in Alkohol durch Hinzufügen von $HgCl_2$-Lösung und Gerinnung mit Äther gewonnen.

---

[1]) Über die Ptomaine **3**, 77. Berlin 1886.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **27**, 167.

[3]) Ebendaselbst **35**, 2750.

Um das schwer lösliche Betainsalz aus den Kichererbsenphosphatiden zu gewinnen, löste ich einen Teil der Base in Alkohol und ließ die Lösung mit heißer, mit $HgCl_2$ gesättigter Alkohollösung gerinnen. Die gewonnene kristallinische Masse habe ich durch zweimaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt. Das im Vakuumexsikkator getrocknete Doppelsalz schmilzt bei gleichzeitiger Zersetzung gegen 248°.

Die Bestimmung des Quecksilbers der Verbindung geschah folgendermaßen: die bei 100° getrocknete Substanz wurde gewogen, in Wasser gelöst und bis zum Sieden erhitzt, während durch die Lösung ein Strom von H_2S durchgeleitet wurde. Das erhaltene HgS wird auf einem gewogenen Filter abgewogen und bis zur Gewichtskonstanz bei 100° getrocknet. Die Ergebnisse lauten wie folgt:

Gefunden: I	67,80	Proz.	Hg
II	67,75	„	Hg
Berechnet für $(C_5H_{12}NO_2Cl)6\,HgCl_2$ . .	67,49	„	Hg

Nach der Entfernung des H_2S auf dem Wasserbad wurden die Filtrate mit $CaCO_3$ gemischt und auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft. Im Trockenrückstand wurde das Chlor als $AgCl$ bestimmt. Es ergab sich:

Gefunden: I	26,30	Proz.	Cl
II	26,08	„	Cl
Berechnet für $C_5H_{12}NO_2 . 6\,HgCl_2$ . . .	25,93	„	Cl

Aus der Gesamtheit aller Analysenresultate läßt sich feststellen, daß die mittels Hydrolyse isolierte Base der Kichererbsenphosphatide Betain ist. Auf diese Weise wird auch dargetan, daß die Phosphatide neben anderen organischen Basen — hauptsächlich Cholin — auch Betain enthalten können. Ungelöst bleibt die Frage, ob das Betain auch in Phosphatiden tierischer Herkunft vorhanden ist. Es ist jedoch interessant zu erwähnen, daß das Betain — eine Substanz, die man als rein vegetabilischen Ursprungs erachtete — von *Smorodinzew* im Nierengewebe des Kalbes aufgefunden wurde[1]).

---

[1]) Inaug.-Diss. d. Universität Moskau.

Über die Wirkung der Kationen der Ringerlösung auf die glatte Muskulatur des Meerschweinchenuterus.

Nach Versuchen von Friedrich Holup.

Von

M. Kochmann.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Halle-Wittenberg.)

(Eingegangen am 20. Juni 1925.)

Die Wirkung der im Blute vorkommenden anorganischen Salze ist in den letzten 10 Jahren Gegenstand erhöhten Interesses geworden. Welchen Einfluß sie auf die Muskulatur des Herzens haben, ist bereits ausführlich bearbeitet worden. Dagegen ist ihre Einwirkung auf die Organe mit glatter Muskulatur ein bisher wenig erforschtes Gebiet, und doch ist zweifellos für die normale Funktion dieser Organe die Ionenkonzentration und ihr Mengenverhältnis untereinander von großer Bedeutung.

Bisher liegen in der Literatur Arbeiten von *Fienga* vor, der die Einwirkung reiner Salzlösung an der glatten Muskulatur des Hühnerösophagus beschrieb. Als Ergebnis stellte er fest, daß Kalium, Calcium, Strontium und Barium bei Verwendung in nicht zu starker Konzentration den Tonus steigern, während Natrium, Lithium und Magnesium ihn vermindern. Ähnliches fand *Pugliese* beim Ösophagus und Magen des Frosches und beim Retractor penis des Pferdes. Nach *Trendelenburg* ist das Natrium auf den Kontraktionszustand der Bronchialmuskulatur gar nicht wirksam, Kalium bedingt eine nicht sehr starke Verkürzung, während Calcium eine kräftige Tonussteigerung hervorruft. In neuerer Zeit haben *Tezner* und *Turolt* festgestellt, daß Calciumzusatz zur Ringerlösung die Magenbewegungen hemmt und daß Kaliumzusatz die Automatie erregt. Die Erregung wird nicht durch Atropin, wohl aber durch Papaverin aufgehoben. Bei großen Gaben von Kalium steigert sich die Wirkung bis zum muskulösen Krampf. In calciumfreier Nährlösung tritt eine Hemmung der Magenbewegung ein, während in kaliumfreier Lösung einige Präparate eine Verstärkung, einige eine Hemmung oder rhythmische Bewegung aufweisen.

Des weiteren hat *Rosemann* unter *Wasicky* die Wirkung der K- und Ca-Ionen an überlebenden glattmuskeligen Organen (Darm, Uterus, Harnblase) untersucht. Er benutzte Ca- und K-freie Ringerlösungen und setzte zu diesen steigende Konzentrationen von Calciumchlorid und Kalium-

chlorid hinzu. Es zeigte sich, daß Kalk bis etwa zu der Konzentration der normalen Ringerlösung eine erregende, Kaliumchlorid eine hemmende Wirkung ausübt. Wurden die Konzentrationen der normalen Ringerlösung an K und Ca wesentlich überschritten, so trat durch Ca eine Hemmung, durch K eine Erregung ein. Dies würde in Übereinstimmung zu den Versuchen von *Tezner* und *Turolt* stehen.

Es ist aus der Versuchsanordnung ersichtlich, daß hier nicht vollkommen isotonische Lösungen verwandt wurden, und daß das Verhältnis der Kationen Na, K und Ca der Ringerlösung eine Veränderung erlitten hat, daß mit anderen Worten die Menge des Na-Kations im Verhältnis zu den übrigen unberücksichtigt geblieben ist.

Da wir aus den Versuchen von *Meltzer* und *Auer* über den Antagonismus von Calcium und Magnesium wissen, daß das Na-Ion eine gewisse Wirkung entfalten kann, so schien es nicht ohne Wert zu sein, von diesem Standpunkt aus die Wirkung der Kationen auf ein glattmuskeliges Organ noch einmal zu untersuchen.

Wir wählten als solches den Uterus von Meerschweinchen, der nach der Methode von *Magnus-Kehrer* isoliert wurde. Es kamen hauptsächlich nicht gravide und nur einzelne gravide Uteri zur Verwendung, wobei ein grundsätzlicher Unterschied der Versuchsergebnisse nicht beobachtet werden konnte.

Im einzelnen wurde von mir die früher beschriebene Versuchsanordnung angewendet.

Von dem Uterus, der dem entbluteten Meerschweinchen unter möglichst schonender Behandlung entnommen wird, wird das eine Horn in der gewöhnlichen Weise in 30 ccm Ringerlösung aufgehängt, indem das untere Ende an ein rechtwinkliges Glasrohr geknüpft und die Spitze des Horns mit einem Schreibhebel in Verbindung gebracht wird, der durch ein kleines Laufgewicht von 1,5 g passend belastet wird. Die Belastung darf nicht zu klein gewählt werden, da sonst nach einer Kontraktion ein Verkürzungsrückstand störend wirken kann.

Die Präparation geschieht in kalter Ringerlösung. Der Schreibhebel schreibt mit anderthalbfacher Vergrößerung auf ein langsam sich drehendes Kymographion.

Der kleine Glaszylinder, in dem sich das isolierte Horn in der Ringerlösung befindet, steht in einem kleinen Akkumulatorenglase, das als Wasserbad dient und dessen Inhalt durch Flamme (Bunsenbrenner, dessen Schornstein abgeschraubt ist) und Thermoregulator auf 35° C (nicht höher) gehalten wird. Das Glasrohr, das zur Befestigung des Uterushorns dient, steht durch einen Gummischlauch mit einem Dreiwegehahn in Verbindung, der nach oben durch einen 20 cm langen Schlauch mit einem Trichter, nach unten mit einem 70 cm langen Glasrohr verbunden ist.

Vom Trichter aus läßt sich das ganze Rohrsystem mit Ringerlösung füllen, und durch die verschiedene Stellung des Hahnes wird der Inhalt des Zylinderglases bald mit dem Trichter, bald mit dem Glasrohr in Verbindung gebracht. Dieser Apparat dient zum Wechseln der Ringerlösung in dem Zylinderglase, indem man durch Heberwirkung heraussaugt bzw. frische Ringerlösung durch den Trichter in das Zylinderglas einfüllt.

Die Durchlüftung der Ringerlösung im Zylinder geschieht von einem mit Luft gefüllten Gasometer durch ein unten ausgezogenes Glasrohr, welches an das Rohr angebunden ist, das zur Befestigung des Uterushorns dient und mit diesem bis auf den Boden herabreichen muß.

Die benutzte Normalringerlösung hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	9,00
KCl	0,42
$CaCl_2$	0,24
$NaHCO_3$	0,2
Aqua dest. ad 1000,0	

Zur Verwendung kamen zum größten Teil der Warmblüterringerlösung isotonische Lösungen mit normalem $NaHCO_3$-Gehalt und einige, deren Isotonie aus besonderen Gründen nicht so streng gewahrt werden konnte.

Es wurden in der ersten Reihe der Versuche solche isotonische Lösungen verwendet, bei denen zwei der Kationen vollständig fortgelassen und durch das dritte ersetzt wurden: Also z. B. alles KCl und $CaCl_2$ wird durch NaCl ersetzt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde nur ein Kation gänzlich fortgelassen, und so wurde entweder bei unverändert bleibendem zweiten das dritte entsprechend vermehrt und umgekehrt. Z. B. wenn NaCl ganz fortfällt und man KCl unverändert läßt, vermehrt man $CaCl_2$ um die Menge, die dem NaCl entspricht, oder umgekehrt, man läßt $CaCl_2$ unverändert und muß dann KCl entsprechend vermehren. Durch Zusammengießen von zwei Lösungen der ersten Versuchsreihe erhält man gleichfalls eine isotonische Lösung, bei der ein Kation vollständig fehlt.

Eine weitere Versuchsreihe beschäftigte sich mit solchen isotonischen Lösungen, in denen eins der Kationen um die Hälfte vermindert wurde und bei gleichbleibenden zweiten zum dritten zugeschlagen wurde und umgekehrt.

Außer diesen streng isotonischen Lösungen wurden auch solche benutzt, in denen eine Isotonie durch Vermehrung oder teilweise Entziehung eines Kations in geringem Maße gestört war, indem z. B. zur normalen Ringerlösung noch etwas NaCl oder KCl oder $CaCl_2$ hinzugefügt oder daraus entfernt wurde.

Die Ergebnisse lassen sich aus den weiter unten folgenden Tabellen entnehmen, in denen 0 das Fehlen des betreffenden Kations bedeutet, $+/2$ die Verminderung auf die Hälfte des normalen Gehaltes, $\pm$ den Gehalt der normalen Ringerlösung an diesem Kation, + bedeutet Vermehrung. Schließlich bezeichnet 0 NaCl + $\frac{1}{2}$ KCl-R + $\frac{1}{2}$ $CaCl_2$-R, daß eine KCl-Ringerlösung mit einer $CaCl_2$-Ringerlösung zu gleichen Teilen zusammengegossen ist.

Zur besseren Übersicht wurden die Tabellen folgendermaßen in fünf Gruppen geordnet:

I. Fehlen zweier Kationen.
II. Fehlen eines Kations.
III. Ein Kation um die Hälfte vermindert.
IV. Normaler Gehalt eines Kations.
V. Vermehrung eines Kations.

Jede der Gruppen hat wiederum drei Unterabteilungen, je eine für NaCl, eine für KCl, eine für $CaCl_2$.

Es ist natürlich, daß bei dieser Aufstellungsweise der Tabellen Wiederholungen eintreten mußten, weil eben jede Lösung von den verschiedensten Gesichtspunkten aus betrachtet wurde. Aber nur so ließ sich eine gewisse Übersichtlichkeit hineinbringen.

Die nicht streng isotonischen Lösungen wurden mit * versehen.

I. Fehlen von zwei Kationen.

a)

Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
+	0	0	steigt stark	stark gestört	unvollständig

Die Lösung entspricht einem Gehalt von 0,947 Proz. NaCl und 0,02 Proz. $NaHCO_3$.

b)

Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
0	+	0	sinkt stark	erloschen	unvollständig

Die Lösung entspricht einem Gehalt von 1,21 Proz. KCl und 0,02 Proz. $NaHCO_3$.

c)

Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
0	0	+	fällt	erloschen	unvollständig

Die Lösung entspricht einem Gehalt von 1,62 Proz. $CaCl_2$ und 0,02 Proz. $NaHCO_3$.

II. Fehlen eines Kations.

a)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	0	±	+	sinkt	vollständig erloschen	unvollständig
2	0	+	±	steigt	gestört (vielleicht etwas gefördert)	„
3	0	1/2 KCl—R	1/2 $CaCl_2$—R	Kontraktur	vollkommen erloschen	keine

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0	0,042	1,55	0,02
2	0	1,15	0,024	0,02
3	0	0,6	0,81	0,02

b)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	0	+	steigt	anfangs erloschen, kehrt aber wieder	unvollständig
2	+	0	±	steigt stark	schnelle vermehrte Pendelbewegungen	reversibel
3	1/2 NaCl—R	0	1/2 $CaCl_2$—R	„ „	erlischt vollständig	unvollständig
*4	±	0	±	„ „	regelmäßig, aber beschleunigt	„
5	+	0	+/2	„ „	etwas beschleunigt, unregelmäßig	„

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,9	0	0,079	0,02
2	0,933	0	0,024	0,02
3	0,475	0	0,8	0,02
*4	0,9	0	0,024	0,02
5	0,914	0	0,012	0,02

c)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	+	0	sinkt	erhalten, *seltener werdend*, leicht beschleunigt	unvollständig
2	+	±	0	„	später undeutlich	reversibel
3	1/2 NaCl—R	1/2 KCl—R	0	„	vollständig erloschen	„
*4	±	±	0	„	erloschen	„

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,9	0,06	0	0,02
2	0,914	0,042	0	0,02
3	0,475	0,6	0	0,02
*4	0,9	0,042	0	0,02

III. Ein Kation um die Hälfte vermindert.

a)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	+/2	±	+	sinkt	erloschen	unvollständig
2	+/2	+	±	sofort kontrakt. Stillstd.	vollständig erloschen	„

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,45	0,042	0,774	0,02
2	0,45	0,61	0,024	0,02

Als Anhang: Na nicht ganz um die Hälfte vermindert.

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	1/2 NaCl—R	0	1/2 $CaCl_2$—R	steigt stark	vollständig	unvollständig
2	1/2 NaCl—R	1/2 KCl—R	0	sinkt wenig	verlangsamt	reversibel

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaCHO_3$
1	0,475	0	0,8	0,02
2	0,475	0,6	0	0,02

b)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	+/2	+	steigt wenig	regelmäßig	nicht ganz vollständig
2	+	+/2	±	" "	*verlangsamt*	unvollständig
*3	±	+/2	±	steigt	unregelmäßig, beschleunigt	"

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaCHO_3$
1	0,9	0,021	0,051	0,02
2	0,916	0,021	0,024	0,02
*3	0,9	0,021	0,024	0,02

c)

	Na	K	$CaCl_2$	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	+	+/2	sinkt	regelmäßig, aber häufiger	vollständig
2	+	±	+/2	sinkt wenig	verlangsamt	"
3	+	0	+/2	steigt stark	unregelmäßig beschleunigt	unvollständig
*4	±	±	+/2	sinkt	erloschen, aber wiederkehr.	reversibel

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,9	0,051	0,012	0,02
2	0,907	0,042	0,012	0,02
3	0,914	0	0,012	0,02
*4	0,9	0,042	0,012	0,02

IV. Normaler NaCl-Gehalt.

a)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	0	+	steigt	anfangs erloschen, *kehrt wieder*	unvollständig
2	±	+	0	sinkt	erhalten, später seltener	„
3	±	+/2	+	steigt wenig	regelmäßig	„
4	±	+	+/2	sinkt	regelmäßig, aber *häufiger werdend*	reversibel
*5	±	±	0	„	erloschen	„
*6	±	±	+/2	„	erloschen, aber wiederkehrend	„
*7	±	0	±	steigt *stark*	beschleunigt	unvollständig
*8	±	+	±	steigt	regelmäßig, später gefördert	es handelt sich um allmählich. Zusatz
*9	±	±	+	„	anfangs erhalten, später beschleunigt	nicht reversibel

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,9	0	0,079	0,02
2	0,9	0,06	0	0,02
3	0,9	0,021	0,051	0,02
4	0,9	0,051	0,012	0,02
*5	0,9	0,042	0	0,02
*6	0,9	0,042	0,012	0,02
*7	0,9	0	0,012	0,02
*8	0,9	0,19—0,64	0,024	0,02
*9	0,9	0,042	0,04—0,103	0,02

b) Normaler KCl-Gehalt.

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	+	±	0	sinkt	leicht beschleunigt, später undeutlich werdend	reversibel
2	0	±	+	„	vollständig erloschen	unvollständig
3	+/2	±	+	„	erloschen	„
4	+	±	+/2	„	verlangsamt	vollständig
*5	±	±	+/2	„	erloschen, ab. *wiederkehrend*	reversibel
*6	±	±	0	„	erloschen	„
*7	+	±	±	sinkt wenig	regelmäßig, später etwas verlangsamt	gering, allmählich Zusatz
*8	±	±	+ allm. Zusatz	steigt	etwas gefördert	nicht reversibel

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,914	0,042	0	0,02
2	0	0,042	1,55	0,02
3	0,45	0,042	0,75	0,02
4	0,907	0,042	0,012	0,02
*5	0,9	0,042	0,012	0,02
*6	0,9	0,042	0	0,02
*7	0,957—1,33	0,042	0,012	0,02
*8	0,9	0,042	0,04—0,103	0,02

c)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	+	0	±	**steigt stark**	**vermehrte schnelle Pendelbewegungen**	**reversibel**
2	0	+	±	**steigt**	**gestört, vielleicht etwas gefördert**	**unvollständig**
3	+/2	+	±	**sofort Kontraktur**	*erloschen*	"
4	+	+/2	±	**steigt etwas**	**regelmäßig etwas verlangsamt**	"
*5	±	+/2	±	**steigt**	**unregelmäßig, etwas beschleunigt**	"
*6	±	0	±	**steigt stark**	**regelmäßig, aber beschleunigt**	**nicht reversibel**
*7	+	+	±	**sinkt wenig**	**anf. regelmäßig, später etwas verlangsamt**	**allmähl. Zusatz d. betr. Kations**
*8	±	+	±	**steigt**	**anf. regelmäßig, später etwas gefördert**	"

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,933	0	0,024	0,02
2	0	1,15	0,024	0,02
3	0,45	0,61	0,024	0,02
4	0,916	0,021	0,024	0,02
*5	0,9	0,021	0,024	0,02
*6	0,9	0	0,024	0,02
*7	0,957—1,33	0,042	0,024	0,02
*8	0,9	0,19—0,64	0,024	0,02

V. Vermehrung eines Kations.

a)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	+	0	±	**steigt stark**	**schnelle vermehrte** ***Pendelbewegung***	**reversibel**
2	+	±	0	**sinkt**	**leicht beschleunigt,** ***später undeutlich***	"
3	+	0	+/2	**steigt**	**unregelmäßig** ***beschleunigt***	**nicht reversibel**
4	+	±	+/2	**sinkt wenig**	**verlangsamt**	**reversibel**
5	+	+/2	±	**steigt wenig**	**regelmäßig, aber** ***etwas verlangsamt***	**nicht ganz vollständig**
*6	+	±	±	**sinkt wenig**	**anfangs regelmäßig, später etwas verlangsamt**	

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,933	0	0,024	0,02
2	0,914	0,042	0	0,02
3	0,933	0	0,012	0,02
4	0,475	0,6	0	0,02
5	0,916	0,021	0,024	0,02
*6	0,957—1,33	0,042	0,024	0,02

b)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	±	+	0	sinkt	erhalten, später seltener werdend, gestört	nicht vollständ.
2	0	+	±	steigt	vielleicht etwas *gefördert*	unvollständig
3	+/2 NaCl—R	+/2 KCl—R	0	sinkt	vollständig erloschen	reversibel
4	0	+/2 KCl—R	+/2 $CaCl_2$—R	steigt, später Stillstand	„ „	nicht reversibel
5	+/2	+	±	sof. Kontraktur	„ „	unvollständig
6	±	+	+/2	sinkt	regelmäßig, aber *häufiger werdend*	reversibel
*7	±	+	±	steigt	anfangs unverändert, bei weit. Zusatz gefördert	allmähl. Zusatz von KCl

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0,9	0,06	0	0,02
2	0	1,15	0,024	0,02
3	0,475	0,6	0	0,02
4	0	0,6	0,81	0,02
5	0,45	0,61	0,024	0,02
6	0,9	0,051	0,012	0,02
*7	0,9	0,19—0,64	0,024	0,02

c)

	Na	K	Ca	Tonus	Rhythmik	Reversibilität
1	0	+/2 KCl—R	+/2 $CaCl_2$—R	steigt	vollständig erloschen	nicht reversibel
2	+/2 NaCl—R	0	+/2 $CaCl_2$—R	steigt stark	erloschen	unvollständig
3	±	0	+	steigt	anfangs erloschen, kehrt aber wieder	„
4	0	±	+	sinkt stark	vollständig erloschen	„
5	+/2	±	+	sinkt	erloschen	„
6	±	+/2	+	steigt wenig	regelmäßig	„
*7	±	±	+	steigt	anfangs erhalten, später gefördert	„

Gehalt der Lösungen in Prozenten:

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$
1	0	0,6	0,81	0,02
2	0,475	0	0,81	0,02
3	0,9	0	0,79	0,02
4	0	0,042	1,55	0,02
5	0,45	0,042	0,75	0,02
6	0,9	0,021	0,051	0,02
*7	0,9	0,042	0,04—0,105	0,02

Es ergibt sich nun folgendes:

1. Eine vollständig durch NaCl ersetzte Ringerlösung wirkt tonussteigernd;

eine vollständig durch KCl ersetzte Ringerlösung wirkt tonussenkend;

eine vollständig durch $CaCl_2$ ersetzte Ringerlösung wirkt tonussenkend.

2. In den der Ringerlösung isotonischen oder nahezu isotonischen Lösungen findet sich:

Bei NaCl-Verminderung oder NaCl-Freiheit eine Tonussteigerung, wenn KCl vermehrt ist, eine Tonussenkung, wenn $CaCl_2$ vermehrt ist; vorausgesetzt, daß nicht ein Kation überhaupt fehlt;

bei KCl-Verminderung oder KCl-Freiheit stets eine Tonussteigerung, gleich, ob $CaCl_2$-Vermehrung oder NaCl-Vermehrung vorliegt;

bei $CaCl_2$-Verminderung oder $CaCl_2$-Freiheit stets eine Tonussenkung, gleich, ob NaCl-Vermehrung oder KCl-Vermehrung vorliegt.

Oder vom Standpunkt der Vermehrung aus betrachtet:

NaCl-Vermehrung wirkt tonussteigernd bei KCl-Verminderung und KCl-Freiheit, tonussenkend bei $CaCl_2$-Verminderung und $CaCl_2$-Freiheit;

KCl-Vermehrung wirkt tonussteigernd bei NaCl-Verminderung und NaCl-Freiheit, tonussenkend bei $CaCl_2$-Verminderung und $CaCl_2$-Freiheit;

$CaCl_2$-Vermehrung wirkt tonussteigernd bei KCl-Verminderung und KCl-Freiheit, tonussenkend bei NaCl-Verminderung und NaCl-Freiheit.

Zur Normalringerlösung in kleinen Mengen zugesetzt, wirken

NaCl . . . . tonussenkend
KCl . . . . tonussteigernd
$CaCl_2$ . . . . tonussteigernd

Ringerlösung mit halbem Kaliumgehalt bewirkt geringe Tonussteigerung.

Ringerlösung mit $^1/_{10}$ $CaCl_2$-Gehalt bewirkt Tonussenkung.

Kaliumfreie Ringerlösung wirkt stark tonussteigernd.

Kalkfreie Ringerlösung wirkt stark tonussenkend.

3. Was den Einfluß der Versuchslösungen auf den Rhythmus betrifft, so läßt sich mit Bestimmtheit sagen, daß die Rhythmik dann stark gestört ist, wenn die zu untersuchende Lösung eine erhebliche Tonussteigerung oder Tonussenkung hervorruft. Auffallend ist, daß bei gänzlichem Fehlen von NaCl oder bei Verminderung des NaCl um die Hälfte meistens sehr große Rhythmusstörungen auftreten, während diese bei Verminderung und Fehlen von KCl oder $CaCl_2$ oft nicht so hochgradig sind. Es liegt somit der Gedanke nahe, daß vielleicht dem NaCl, das die Hauptmenge der Kationen der Ringerlösung darstellt, eben aus diesem Grunde ein Einfluß auf den Ablauf der normalen Rhythmik zukommt, eine Wirkung, die wiederum nicht dem NaCl als solchem zuzuschreiben, sondern die auch hier vom Standpunkt der Ionenverschiebung zu beurteilen wäre.

Ein bestimmter gesetzmäßiger Einfluß der einzelnen Kationen auf den Ablauf der Rhythmik im Sinne einer Förderung oder Hemmung ließ sich im großen und ganzen nicht feststellen. Es zeigte sich, daß

sowohl Lösungen mit halbem als auch solche mit vermehrtem KCl-Gehalt (beide nicht isotonisch) eine leichte Förderung des Rhythmus hervorrufen. Ebenso wirkt auch eine Ringerlösung mit wenig vermehrtem $CaCl_2$-Gehalt. Normalringerlösung, der NaCl in kleinen Mengen zugesetzt wird, zeigt dagegen eine allmählich zunehmende Verlangsamung der Muskeltätigkeit.

Wir sehen somit, daß man die Wirkung der Kationen der Ringerlösung bzw. des Blutes nicht allein vom Standpunkt des Kaliums oder Calciums betrachten darf, sondern auch das Natrium berücksichtigen muß.

Die Versuche sowohl von *Tetzner* und *Turolt* als von *Rosemann* lassen sich größtenteils in diese Betrachtungsweise einreihen. Wo Abweichungen vorhanden sind, sind sie dadurch zu erklären, daß die Änderung des Natriumgehaltes ihren Einfluß geltend macht.

Die geschilderten Versuche werden in Kürze erweitert und ergänzt werden.

Literatur.

1) *R. Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 4. Aufl., 1914, S. 508. — 2) *G. Fienga*, Zeitschr. f. Biol. **54**, 230, 1910; *Pugliese*, Arch. ital. d. Biol. **46**, 371, 1906. — 3) *P. Trendelenburg*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **69**, 79, 1912. — 4) *O. Tezner* und *M. Turolt*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **24**, 1, 1921. — 5) *M. Rosemann* Klin. Wochenschr. 1922, S. 2093. — 6) *M. Kochmann*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 305, 1921.

Gesamtjodbestimmung in Organen, Blut und Harn.

Von

Richard v. Bodó.

(Aus dem pharmakologischen Institut der k. ungar. Elisabeth-Universität Pécs.)

(Eingegangen am 21. Juni 1925.)

In einer früheren Mitteilung[1]) wurde eine Methode beschrieben zur Bestimmung des ionisierten Jods im Harn. Im folgenden sei ein Verfahren mitgeteilt, welches die Bestimmung des Gesamtjods in Harn, Blut und Organen gestattet, gleichviel, ob dieses ionisiert oder organisch gebunden ist. Es gibt bereits viele Methoden zur Bestimmung des Gesamtjods, fast sämtliche sind jedoch recht umständlich, ohne zuverlässige Resultate zu ergeben.

Eine der ältesten ist die *Baumann*sche[2]) Methode, bei welcher bekanntlich die Veraschung der Organe in Gegenwart alkalischer Stoffe, namentlich von Ätznatron oder Soda und Salpeter, geschieht, um nach Ansäuern das Jod durch Nitrite frei zu machen und nach Ausschütteln der Kolorimeterbestimmung zuzuführen. Die Jodausscheidung erfolgt aber meistens nicht quantitativ, so daß die Methode kleinere Mengen ergibt als tatsächlich vorhanden sind.

Eine weitere ziemlich verbreitete Methode ist die *Blum-Gruetzner*sche[3]), die zwar bessere Werte ergibt, wegen ihrer Umständlichkeit und Langwierigkeit jedoch zu Versuchsreihen nicht gut anwendbar ist.

Erwähnt sei weiterhin das Verfahren von *Baubigny* und *Chavanne*[4]), bei welcher die Aufschließung im sauren Medium geschieht, und zwar mittels konzentrierter H_2SO_4 und Chromsäure, das entstandene Jodat durch $AgNO_3$ gebunden wird, das Chlor und Brom gasförmig entweicht

---

[1]) *R. v. Bodó*, Jodidbestimmung im Harn, diese Zeitschr. **160**, 386, 1925.
[2]) *B. Baumann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 489, 1895; **22**, 1, 1896/97.
[3]) *F. Blum* und *R. Gruetzner*, ebendaselbst **85**, 429, 1913; **91**, 392, 1914.
[4]) *Baubigny* und *Chavanne*, Chem.-Ztg. **35**, 906; C. r. **136**, 1197.

und danach das $Ag JO_3$ mit Natriumsulfit reduziert und in einem Gooch-tiegel gemessen wird.

Bei der Methode von *Buchholtz*[1]) des im Blut enthaltenen Jods wird das Jod bei alkalischer Reaktion durch Permanganat in Jodat umgewandelt, der Überschuß von Permanganat durch Alkohol reduziert und letzteres durch Kochen vertrieben. Die Lösung wird filtriert und zur Entfernung der Nitrite mit Essigsäure und Ammoniumchlorid gekocht, wobei die Nitrite auf Wasser und Stickstoff zerfallen. Die Jodate werden nach Zugabe von Jodid und Salzsäure titriert.

Die genauesten Werte scheint die Methode von *Kendall* und *Richardson*[2]) zu ergeben, bei welcher die Veraschung auf recht komplizierte Weise in mehreren Phasen geschieht in Gegenwart von NaOH und $Ba(OH)_2$, danach wird die alkalische Schmelze gelöst und filtriert, zur Lösung Natriumbisulfit gegeben, dann mit Phosphorsäure neutralisiert bzw. angesäuert und das Jod durch Brom in Jodat oxydiert. Der Überschuß von Brom wird durch Erhitzen entfernt. Um das etwa zurückgebliebene Brom zu binden, wird etwas Salicylsäure und nach Erkalten der Lösung KJ und Säure zugefügt und mit $Na_2S_2O_3$ titriert. Durch diese Methode können auch recht kleine Mengen von Jod bestimmt werden, jedoch erschwert die Umständlichkeit ihre Anwendung.

Die Methode, die ich im folgenden mitteilen möchte, ist äußerst einfach, führt rasch zum Ziele und gibt dabei selbst bei kleinsten Jodmengen sehr genaue Werte. Ihr Prinzip ist, daß wir das Material nach Eindampfen in alkalischem Medium (NaOH oder KOH) mit Hilfe von Salpeter verbrennen, nach Auflösen und Filtration der Schmelze die gewonnene Lösung genau neutralisieren und danach eine Jodidbestimmung nach dem *L. Winkler*schen[3]) Prinzip mit derselben vornehmen, d. h. die Jodide mit Chlorwasser in Jodate umwandeln (somit die sechsfache Menge des ursprünglich vorhandenen Jods zur Bestimmung gelangt), den Überschuß von Chlor durch Erhitzen entfernen und zur abgekühlten Lösung KJ und Säure geben und mit $Na_2S_2O_3$ titrieren.

Zur Erläuterung des Verfahrens diene folgendes:

Das Eindampfen mit Lauge ist bei Harn, Blut und auch bei den Organen deshalb angebracht, weil auf diese Weise bei der späteren Verbrennung das Spritzen vermieden wird. Die Anwendung von NaOH ist zweckmäßiger als die von KOH, weil bei letzterem die Gefahr des Spritzens stets größer ist.

Beim Verbrennen ist es deshalb zweckmäßig, Salpeter anzuwenden, weil dadurch die Verbrennung in viel kürzerer Zeit vollständig wird,

---

[1]) *J. Buchholtz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **81**, 289, 1917.
[2]) *E. C. Kendall* und *Richardson*, Journ. of biol. Chem. **43**, 161, 1920; *E. C. Kendall*, ebendaselbst **43**, 149, 1920.
[3]) *L. Winkler*, Pharmazeutische Zentralhalle **63**, 384.

als ohne denselben. KNO_3 wirkt energischer als $NaNO_3$, jedoch ist letzteres, was das Stoßen anbelangt, weniger gefährlich. Von dem Salpeter streuen wir wiederholt ganz kleine Mengen (etwa 0,005 bis 0,010 g) auf die zu verbrennende Substanz, und zwar so lange, bis die Schmelze auf Zugabe von Salpeter nicht mehr schäumt, also keine organische Substanz mehr zugegen ist.

Besonders zu achten ist nach Auflösen der Schmelze auf ihre Neutralisation bzw. Ansäuerung, da das Gelingen der danach folgenden Jodidbestimmung in hohem Maße von der Acidität der Lösung abhängt. Da das Eindampfen bzw. die Veraschung in Gegenwart von viel Lauge (5 bis 10 g) erfolgt, wenden wir zur Neutralisation der Schmelze 50proz. H_2SO_4 oder 37proz. HCl an, um die Lösung möglichst wenig zu verdünnen. Als Indikator dient das Methylorange, und sobald die Farbe der Lösung in Rot umschlägt (in Anbetracht der verwendeten konzentrierten Säure), sind wir weit über den Neutralpunkt und müssen nun mit schwacher Lauge bis zur Übergangsfarbe wieder zurücktitrieren. Danach geben wir, um den optimalen Säuregrad zu erreichen, noch 1 ccm n HCl zur Lösung. Andere Säuren, z. B. Eisessig oder konzentrierte Phosphorsäure, dürfen nicht verwendet werden, da sie zur Pufferbildung führen, wodurch die Neutralisation unvollständig wird und somit die Bestimmung falsche Werte ergibt.

Vom Chlorwasser ist verhältnismäßig viel anzuwenden, weil es nicht allein zur Oxydation des Jodids zu Jodat dient, sondern auch dazu, daß die Nitrite, die teilweise durch die Oxydation der stickstoffhaltigen Substanzen, teilweise durch die Reduktion der zugegebenen Nitrate (Salpeter) entstehen, zu Nitraten oxydiert werden. Es konnte experimentell bewiesen werden, daß das Chlorwasser selbst große Mengen von Nitriten vollständig zu Nitraten oxydiert.

Die Bestimmung geschieht im einzelnen auf folgende Art: Die zu bestimmende Substanz: Harn, Blut oder Organ, wird zur Vermeidung von Verlusten durch Spritzen in einen möglichst hohen und schmalen Nickel- oder Silbertiegel gegeben und mit pulverisiertem $NaOH$ bestreut. Zu 25 ccm Harn oder bei Anwendung von etwa 2 g Organsubstanz bzw. Blut genügen 5 g $NaOH$, bei größeren Organmengen sind schon 10 g nötig. Das Ganze wird auf einem Wasserbad eingedampft, bis der Harn oder das Blut trocken ist bzw. das Organ sich verflüssigt hat. Danach erfolgt die Verbrennung, und zwar so, daß wir mehrmals 0,005 bis 0,010 g $NaNO_3$ auf die Substanz streuen, bis kein Schäumen mehr erfolgt. Die abgekühlte Schmelze wird in warmem Wasser gelöst und filtriert (eventuell durch Watte) in einen Kolben von 300 ccm, wobei manchmal auf dem Filter Nickelpartikelchen zurückbleiben;

zu dem vollständig klaren Filtrat werden 1 bis 2 Tropfen Methylorange gegeben, worauf die Neutralisierung und Ansäuerung in oben beschriebener Weise erfolgt. Erfolgt der Farbenumschlag nicht scharf genug, so liegt das daran, daß die Lösung bei der Prozedur sich erwärmt hat. Nach Zugabe von einigen Bimssteinkörnchen geben wir frisch bereitetes, gesättigtes Chlorwasser zur Lösung (auf 25 ccm Harn oder 2 g Organ 15 ccm Chlorwasser) und erwärmen den Kolben auf freier Flamme. Nach Erhitzen von 10 bis 15 Minuten können wir gewiß sein, daß kein Chlor mehr anwesend ist, wir können uns aber davon auch so überzeugen, daß wir 1 Tropfen Methylorange zur Lösung geben: wenn die Lösung die rote Farbe beibehält, ist kein Chlor anwesend. Nach Abkühlen der Lösung geben wir Kaliumjodid hinzu (bei kleinen Jodmengen 10 Tropfen einer 10proz. Lösung) und 20proz. reine (H_3PO_3-freie) Phosphorsäure (10 ccm), ferner Stärke (10 Tropfen einer 1proz. Lösung) und titrieren nach 10 Minuten langem Stehen mit einer $Na_2S_2O_3$-Lösung (0,1 bis 0,005 n).

Von der Brauchbarkeit der Methode überzeugten wir uns, indem wir einerseits bekannte Mengen von reinem KJ, andererseits bekannte Mengen von Jodipin zum Harn bzw. zu den Organen gaben.

Die Resultate der Bestimmungen zeigen die folgenden Tabellen.

Tabelle I.

Harn + KJ.

Zugefügt Jod g	Verbraucht *0,1* n $Na_2S_2O_3$-Lösung ccm	Gefunden sechsfache Menge Jod als HJO_3 g	Gefunden Jod g
	12,02	0,152 56	
0,0255	12,02	0,152 56	**$0{,}0254_3$**
	12,03	0,152 69	
	3,00	0,038 08	
0,0064	3,02	0,038 33	**$0{,}0063_9$**
	3,04	0,038 58	
	Verbraucht *0,01* n $Na_2S_2O_3$-Lösung		
	11,98	0,015 21	
0,0025	12,00	0,015 23	**$0{,}0025_4$**
	12,01	0,015 24	
	2,98	0,003 78	
0,0007	2,96	0,003 76	**$0{,}0006_3$**
	3,00	0,003 81	
	Verbraucht *0,005* n $Na_2S_2O_3$-Lösung		
	3,01	0,001 91	
$0{,}0003_5$	2,96	0,001 88	**$0{,}0003_2$**
	2,99	0,001 89	

Tabelle II. Muskel + K J.

Zugefügt Jod g	Verbraucht *0,1 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung g	Gefunden sechsfache Menge Jod als HJO_3 g	Gefunden Jod g
	12,03	0,152 69	
0,0255	12,02	0,152 56	$0{,}0254_5$
	12,03	0,152 69	
	3,01	0,038 20	
0,0064	3,03	0,038 46	$0{,}0063_9$
	3,02	0,038 33	
	Verbraucht *0,01 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung		
	11,96	0,015 18	
0,0025	11,98	0,015 21	$0{,}0025_4$
	12,00	0,015 23	
	3,00	0,003 81	
0,0007	2,99	0,003 80	$0{,}0006_4$
	3,01	0,003 82	
	Verbraucht *0,005 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung		
	2,95	0,001 87	
$0{,}0003_5$	2,98	0,001 88	$0{,}0003_1$
	2,99	0,001 89	

Tabelle III. Jodbestimmung im verwendeten Jodipin.

Abgewogene Jodipinmenge g	Verbraucht *0,01 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung ccm	Gefunden sechsfache Menge Jod als HJO_3 g	Gefunden Jod g	Jodgehalt des Jodipins Proz.
0,0370	18,91	$0{,}0240_0$	$0{,}0040_0$	10,81
0,0315	16,21	$0{,}0205_7$	$0{,}0034_3$	10,89
0,0339	17,48	$0{,}0221_8$	$0{,}0037_0$	10,91
			Mittel:	10,87

Tabelle IV. Harn + Jodipin.

Zugefügt Jodipin (Jodgehalt *10,87 Proz.*) g	Zugefügt Jod g	Verbraucht *0,01 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung ccm	Gefunden sechsfache Menge Jod als HJO_3 g	Gefunden Jod g
0,0340	$0{,}0036_9$	17,34	$0{,}0220_1$	$0{,}0036_7$
0,0243	$0{,}0026_4$	12,49	$0{,}0158_5$	$0{,}0026_4$
0,0210	$0{,}0022_8$	10,76	$0{,}0136_6$	$0{,}0022_8$

Tabelle V. Muskel + Jodipin.

Zugefügt Jodipin (Jodgehalt *10,87 Proz.*) g	Zugefügt Jod g	Verbraucht *0,01 n* $Na_2S_2O_3$-Lösung ccm	Gefunden sechsfache Menge Jod als HJO_3 g	Gefunden Jod g
0,0258	$0{,}0028_1$	13,29	$0{,}0168_6$	$0{,}0028_1$
0,0327	$0{,}0035_5$	16,70	$0{,}0211_9$	$0{,}0035_3$
0,0273	$0{,}0029_7$	14,11	$0{,}0179_1$	$0{,}0029_8$

Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro.

V. Mitteilung:

Einfluß des Chinins auf die Adsorption des Diphtherietoxins durch die Erythrocyten.

Von

B. Sbarsky und **L. Subkowa.**

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 23. Juni 1925.)

In früheren Mitteilungen[1]) wurde bewiesen, daß die roten Blutkörperchen die Fähigkeit, Eiweißabbauprodukte in größerer oder geringerer Menge zu adsorbieren, besitzen, während dem Serum und Plasma diese Eigenschaft fehlt. Diese Adsorptionsfähigkeit hat sich bei verschiedenen Tieren (Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferden, Hühnern, Tauben) als nicht identisch herausgestellt (2), was durch die verschiedene Beschaffenheit der roten Blutkörperchen oder des Plasmas erklärt werden könnte.

Es schien uns von Interesse, den Einfluß, den die Veränderung des Milieus auf die Adsorption von Eiweißabbauprodukten ausüben könnte, zu untersuchen. Zu diesem Zwecke versetzten wir Blutkörperchen mit Chinin in verschiedenen Mengen und bestimmten die Veränderung, welche die Adsorption von Eiweißabbauprodukten aus dem Diphtherietoxin durch die Zusätze erfuhr.

Versuche in vitro.

Wir wählten Chinin aus folgenden Gründen:

Nocht und *Morgenroth* (3), *Halberkann* (4), *Schilling* und *Boecker* (5) haben eine „Speicherung" des Chinins in den roten Blutkörperchen nachgewiesen. Dies wurde später auch von *Acton* und *King* (6) und anderen bestätigt; näher wurde diese Frage durch Anwendung einer neuen Methode von *Rona*

---

[1]) Erste, zweite, dritte und vierte Mitteilung, diese Zeitschr. **135**, 21; **141**, 33; **141**, 37; **155**, 495.

und *Bach* (7), von *Rona* und *Bloch* (8) im Jahre 1922 erforscht. Zu ihren Versuchen benutzten diese Forscher mit physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschene Erythrocyten, denen sie verschiedene Mengen Chininchlorhydrat zusetzten. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrocyten bestimmten sie die in der Lösung zurückgebliebene Menge Chinin. Sie zeigten, daß Chinin von roten Blutkörperchen in großen Mengen gebunden wird und daß die gebundene Chininmenge mit steigendem Gehalt des Gemisches an roten Blutkörperchen wächst. Es wurde gezeigt, daß 1. die Bindung des Chinins an die roten Blutkörperchen mit unmeßbarer Geschwindigkeit erfolgt und darum die Zeit keinen Einfluß hat, 2. daß die Wasserstoffionenkonzentration auf die Chininbindung ebenfalls ohne Einfluß ist.

Man konnte daher erwarten, daß die mit Chinin belegten Blutkörperchen weniger Eiweißabbauprodukte als nicht behandelte adsorbieren würden. Versuche bestätigten diese Voraussetzung vollständig.

Salzsaures Chinin (*Kahlbaum*) wurde den Erythrocyten zugesetzt, und zwar derartig, daß die Konzentration des Chinins in der gesamten Lösung 0,05 bis 1,5 Proz. betrug. Wegen der geringen Löslichkeit des Chinins konnten größere Konzentrationen nicht angewandt werden. Das Chinin wurde in destilliertem Wasser oder in physiologischer Lösung gelöst, und zwar in solcher Konzentration, daß man den Erythrocyten immer 1 ccm dieser Lösung zusetzte. In der Tabelle I sind die Konzentrationen des Chinins, in Prozenten auf das Volumen der gesamten Ingredienzien (Blut, Eiweißabbauprodukte) bezogen, angegeben. Als Eiweißabbauprodukte benutzten wir unter Toluol in der Kälte aufbewahrtes Diphtherietoxin, von dem eine kleine Portion für jeden Versuch abfiltriert wurde.

Zur Bestimmung der Eiweißabbauprodukte diente die von uns schon in unserer ersten Mitteilung beschriebene Methode von *Bach*. Zur Verwendung kam Oxalatblut oder defibriniertes Blut. Das aus der Ohrvene des Kaninchens gewonnene Blut wurde unter ständigem Umrühren in eine 0,4proz. Ammoniumoxalatlösung aufgenommen, wobei die Blutmenge der Menge der Oxalatammoniumlösung gleich war. Die absolute Menge der adsorbierten Eiweißabbauprodukte hängt von der Menge der Blutkörperchen ab. Da uns im gegebenen Falle nur der Einfluß des Chinins auf diese Adsorption interessierte, so hielten wir es für unnötig, bei allen Versuchen eine gleiche Blutmenge anzuwenden, da ja die ganze Serie nebst allen Kontrollen demselben Gemisch von Blut und Ammoniumoxalat entnommen wurde.

Da in der *Bach*schen Methode zur Bestimmung der Eiweißabbauprodukte die Hauptrolle der Perhydridase (Milch)[1]) zukommt, so schien es vor allem wichtig, den etwaigen Einfluß des Chinins auf die Wirkung

---

[1]) Das Ferment wurde damals noch nicht von uns isoliert. Siehe diese Zeitschr. **155**, 485, 1925.

dieses Ferments bei der Reduktion des Nitrats zu Nitrit in Anwesenheit von Diphtherietoxin klarzulegen. Frischer Milch (Perhydridase) wurden verschiedene Chininmengen, Diphtherietoxin und Nitratlösung zugesetzt. Kontrollversuche mit denselben Substanzen ohne Chininzusatz.

Je 3 ccm Milch wurden mit 1 ccm Chininlösung verschiedener Konzentration, 1 ccm Diphtherietoxin und 1 ccm einer 25proz. Nitratlösung versetzt. In der Kontrolle wurde zum Ausgleich statt Chinin 1 ccm destillierten Wassers zugefügt. Die Proben wurden bei 60° eine halbe Stunde gehalten und darauf der Nitritgehalt nach der bekannten Methode von *Ilosvay-Lunge* bestimmt. Zahlreiche Versuche haben erwiesen, daß in der genannten Konzentration das salzsaure Chinin fast keinen Einfluß auf die Reduktion des Nitrats zu Nitrit ausübt.

Einige Resultate sind in der Tabelle I angeführt.

Tabelle I.

Chinin-konzentration Proz.	N_2O_3 in mg. Versuche Nr.					
	9	11	15	16	20	32
0	0,0244	0,0263	0,0390	0,0259	0,0278	0,0296
0,05	—	—	0,0346	—	0,0278	—
0,10	—	0,0246	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	0,0300
0,25	0,0226	0,0270	0,0346	—	0,0278	—
0,50	0,0254	0,0248	—	0,0259	0,0278	0,0300
0,75	0,0274	0,0273	—	0,0259	—	—
1,00	—	—	—	—	—	—
1,25	0,0259	0,0248	—	—	—	—
1,50	—	—	0,0346	0,0259	—	0,0296

Nachdem festgestellt worden war, daß Chinin keinen Einfluß auf die Bestimmung der Eiweißabbauprodukte hat, wurden Versuche mit Blut angestellt. Eine Reihe von Probierröhrchen wurden mit je 2 ccm Oxalatblut (1 ccm reinem Blute) und 1 ccm salzsaurer Chininlösung verschiedener Konzentration versetzt, zum Kontrollversuch mit je 1 ccm physiologischer Lösung statt Chinin. Die Proben ließ man 15 bis 45 Minuten in einigen Versuchen im Thermostaten bei 37°, in anderen bei Zimmertemperatur stehen. Jede Probe erhielt dann je 1 ccm Diphtherietoxin, und die Reaktionsgemische wurden noch weitere 30 Minuten bei Zimmertemperatur zur Adsorption der Eiweißabbauprodukte aufbewahrt. Darauf wurden je 3 ccm Milch, 1 ccm Nitratlösung zugefügt und die Menge des erhaltenen Nitrits bestimmt. Die in Tabelle II zusammengestellten Resultate lassen unzweideutig den starken Einfluß des Chinins auf die Adsorption der Eiweißabbauprodukte erkennen.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, beträgt bei verschiedenen Konzentrationen des Chinins seine hemmende Wirkung 10 bis 45 Proz. der Adsorption.

Tabelle II.

Chinin-konzentration	Adsorption in Proz.							
	ohne Puffersubstrat					mit Puffersubstrat		
Proz.	1	2	3	4	5	6	7	8
0	78	83,7	70	85	77	84,1	81	77,7
0,05	83	—	77	—	80	75	71	77,4
0,10	80	—	—	84	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—	—	—
0,25	75	71,7	61	77	73	65	50	49,4
0,50	64	65	50	69	—	—	—	—
0,75	61	65	35	68	—	—	—	—
1,00	—	—	—	—	—	—	—	—
1,25	—	57,5	34	58	46	—	—	36,8
1,50	—	—	—	—	—	63	49	—

Ähnliche Versuche wurden auch in Anwesenheit von verschiedenen Puffersubstanzen angestellt, da der Einfluß des Chinins auf die Adsorption von der Wasserstoffionenkonzentration abhängen konnte.

Die Versuche ergaben insofern einige Unterschiede, als in diesem Falle schon die Chininkonzentration von 0,05 Proz. sich als deutlich hemmend erwies (s. Tabelle II, Nr. 6, 7, 8). Käufliches salzsaures Chinin besitzt eine schwache alkalische Reaktion gegen Lackmus und Phloroglucin. Eine ganze Reihe von Versuchen wurde mit vorher durch dezinormale Salzsäurelösung neutralisiertem Chinin angestellt. Die Resultate blieben unverändert. Von der Konzentration 0,1 Proz. ab übte das Chinin eine deutliche hemmende Wirkung aus.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die vom Chinin belegten roten Blutkörperchen die Eiweißabbauprodukte in geringerer Menge als in der Kontrolle ohne Chininzusatz adsorbieren.

Weitere Versuche wurden über den Einfluß der gleichzeitigen Anwendung von Chinin und Toxin (vorher zusammengemischt) auf die Adsorptionsfähigkeit des Blutes ausgeführt.

10 ccm Toxin wurden mit 10 ccm Chininlösung vermischt. 2 ccm aus diesem Gemisch wurden mit 2 ccm Oxalatblut versetzt und auf 30 Minuten im Thermostaten stehengelassen und wie in früheren Versuchen weiter behandelt. Die Konzentration des Chinins betrug 0,05 bis 1,5 Proz. des Volumens des Gesamtgemisches.

Das Resultat zeigte einige Abweichungen.

Die Adsorption wird hier durch das Chinin nicht in demselben Maße wie bei dem aufeinanderfolgenden Zusatz gehemmt. Wahrscheinlich erfolgt in vorliegendem Falle eine Verteilung der Blutkörperchenoberfläche zwischen zwei Substanzen.

Tabelle III.

Chinin-konzentration Proz.	Adsorption in Proz. 1	2	3
0	63,9	52,7	58
0,05	66,9	62,4	61,1
0,10	—	—	—
0,15	—	54,3	66,7
0,25	53,3	—	58,9
0,50	—	—	—
0,75	—	—	—
1,00	—	—	—
1,25	51,2	50,3	56,8
1,50	—	—	—

Noch überzeugender waren die Resultate, wo wir zuerst Toxin den Erythrocyten zufügten, 30 Minuten stehen ließen und erst dann Chinin zusetzten.

Tabelle IV.

Chinin-konzentration Proz.	Adsorption in Proz. 1	2	3	4
0	82,8	78,2	68,5	70,4
0,05	80	78	74,4	63
0,10	—	—	—	—
0,15	—	67,6	61,6	62,8
0,25	73,4	64,8	62,8	61
0,50	—	—	60,7	52,3
1,00	—	—	—	—
1,25	53,3	60,6	58,9	46,7
1,50	—	—	—	—

Die angeführten Beispiele weisen alle darauf hin, daß Chinin sich energischer als Eiweißabbauprodukte mit den Blutkörperchen verbindet, was zu einer Verringerung der Adsorptionsfähigkeit der Blutkörperchen gegenüber Eiweißabbauprodukten führt.

Versuche in vivo.

In der ersten Mitteilung (*Sbarsky*) wurde die Hypothese aufgestellt, daß zwischen der Fähigkeit der Erythrocyten, die Eiweißabbauprodukte zu adsorbieren, und den Erscheinungen der Immunität ein gewisser Zusammenhang bestehe. In der Folge konnten *Sbarsky* und *Michlin* (2) zeigen, daß das Binden der Eiweißabbauprodukte aus dem Diphtherietoxin durch Erythrocyten verschiedener Tiere in direkter Proportion zur Empfänglichkeit derselben Tiere für das Toxin steht. Und zwar adsorbieren die Erythrocyten der Ratten (gegen Diphtherietoxin am wenigsten empfindlich) durchschnittlich 14 Proz. der vorhandenen Eiweißabbauprodukte, die Erythrocyten der Taube, die

gegen Diphtherietoxin am stärksten empfindlich sind, im Mittel etwa 92 Proz.

Da die angehenden Versuche uns belehrten, daß Chinin in vitro die Adsorption der Eiweißabbauprodukte aus dem Toxin hemmt, so lag der Gedanke nahe, den Einfluß des Chinins auch *in vivo*, im Zusammenhang mit der Empfänglichkeit des Tieres gegenüber Diphtherietoxin zu untersuchen. Als Versuchstiere benutzten wir Kaninchen. Im Durchschnitt konnte das Kaninchen leicht und ohne jegliche wesentliche Lebensbeeinträchtigung eine Chinindosis zwischen 0,03 bis 0,05 ccm auf 1 kg Gewicht ertragen. Diese Dosis wurde immer in 8 ccm physiologischer NaCl-Lösung in die Ohrvene oder subkutan eingeführt, und sofort nachher bekam das Kaninchen auf demselben Wege Diphtherietoxin, und zwar in einer minimalen Letaldosis (D. m. l.), für unser Toxin gleich 0,0015 ccm auf 1 kg Gewicht. Die Untersuchungen wurden in der Weise ausgeführt, daß für jede Versuchsreihe vier Kaninchen benutzt wurden, darunter stets eins als Kontrolltier (Toxin allein) und die übrigen drei (Chinin und darauf Toxin) als Hauptversuchstiere. Die Versuche wurden an 38 Kaninchen durchgeführt und ergaben folgende Resultate.

Tabelle V.

Reihenfolge d. Injektion	Chinin, nachher Toxin		Chinin-Toxin im Gemisch		Toxin, nachher Chinin	
Injektionsart	Intravenös	Subkutan	Intravenös	Subkutan	Intravenös	Subkutan
Zahl der Versuchstiere	27	11	55	15	11	9
Versuchstiere überlebten die Kontrolltiere durchschnittlich in Tagen	3	von 8 bis ∽	von 9 bis ∽	∽	$1^1/_2$	von 3 bis ~

Die Kaninchen, welche zuerst Chinin und darauf Toxin intravenös bekamen, überlebten die Kontrollkaninchen um 3 bis 4 Tage, lebten also ungefähr doppelt so lange wie die Kontrolltiere. Die Aktivität des eingeführten Toxins nahm unter dem Einfluß der Chininzufuhr ab, jedoch nicht genügend, um ganz unschädlich zu werden.

Bedeutend bessere Resultate ergaben die subkutanen Einspritzungen. Um in diesem Falle den Tod des Kontrollkaninchens nach 3 bis 4 Tagen hervorzurufen, mußte die Toxindosis verdoppelt werden. Bei subkutaner Injektion überlebten die Kaninchen, welche zuerst Chinin bekamen, die Kontrolltiere mindestens um 7 bis 9 Tage; *die meisten blieben überhaupt am Leben.* Der Unterschied in der Chininwirkung bei intravenöser und subkutaner Injektion ist leicht verständlich.

Es ist tatsächlich von einer größeren Anzahl von Forschern (*Halberkann, Giemsa, Boecker, Rona*) festgestellt worden, daß Chinin nur eine kurze Zeit im zirkulierenden Blut nachzuweisen ist. So zeigte *Boecker* (9), daß nach intravenöser Injektion die ursprüngliche hohe Konzentration des Chinins im Blute sehr schnell herabsank, so daß man schon *nach wenigen Minuten* besonders empfindliche Untersuchungsmethoden anwenden muß, wenn man die verbleibenden *geringen Spuren* nachweisen will. *Rona* und *Bloch* (8) zeigten, daß das Verschwinden des größten Teiles des Chinins aus dem Blute mit außerordentlicher Schnelligkeit erfolgt, *praktisch sofort*. Andererseits geht aus der Arbeit von *Cahn* und *Bronner* (10) hervor, daß ein Teil des subkutan eingespritzten Chinins an der Einspritzungsstelle in Form eines Depots liegen bleibt.

Auf Grund dieser Beobachtungen läßt sich auch der Unterschied der Chininwirkung bei subkutaner oder intravenöser Injektion erklären.

Betrachten wir ein so schnelles Verschwinden des Chinins aus dem zirkulierenden Blute, wie es *Boecker* sogar bei subkutaner Chinineinführung am Menschen gezeigt hat, wo schon nach 10 Minuten Chinin im Urin erscheint, so können wir annehmen, daß zum Moment der Toxineinspritzung nur ein geringer, mit den Blutkörperchen verbundener Teil des Chinins die Adsorption des Diphtherietoxins hemmte. Das ist der Grund, weshalb die Kaninchen, welche Chinin und darauf Toxin bekamen, doch teilweise zugrunde gingen (sogar bei subkutaner Injektion), wenn sie auch in diesen Fällen die Kontrollkaninchen durchschnittlich um 10 Tage überlebten. Man muß daher annehmen, daß die Menge des von den Blutkörperchen gebundenen Toxins in Anwesenheit von Chinin doch genügend war, um den Tod langsam herbeizuführen. Aus den Versuchen in vitro ersehen wir, daß mit Steigerung der Konzentration des Chinins die Menge der von den Blutkörperchen adsorbierten Eiweißabbauprodukte sinkt. Das ist der Grund, weshalb wir bei subkutaner Injektion, wo sich anscheinend ein Depot von Chinin, das in kleinen Dosen in das zirkulierende Blut eindringt, bildet, in vielen Fällen vollständiges Überleben erhielten.

Bedeutend bessere Resultate wurden erlangt, als wir für Injektionen zu einem Gemisch von Chinin und Toxin übergingen. Hier hatten die Erythrocyten gleichzeitig mit Chinin und Toxin zu tun und konnten diese Substanzen nach ihrer entsprechenden Adsorptionsfähigkeit binden.

Die Versuche in vitro zeigten, daß Chinin durch die Erythrocyten stärker gebunden wird als Eiweißabbauprodukte aus dem Toxin. Deshalb konnten wir erwarten, daß das mit Chinin gleichzeitig eingeführte Toxin in vivo in geringerer Menge von den Blutkörperchen gebunden wird und der Einfluß des Toxins folglich ein schwächerer sein würde.

Wir bereiteten das Gemisch unmittelbar vor dem Einspritzen, und zwar so, daß auf 0,1 g Chinin in 7 ccm physiologischer Lösung eine letale Dosis Toxin genommen wurde (diese Zahl schwankte, da wir mit verschiedenen Toxinen arbeiteten). Die Mischung Chinin—Toxin wurde stets ex tempore vorbereitet. Die Versuche wurden wie oben reihenweise mit einem Kontrolltier in jeder Reihe angestellt. Die Versuche wurden an 70 Kaninchen durchgeführt. Resultate in der Sammeltabelle V.

Wir sehen, daß bei gleichzeitiger Einführung von Chinin und Toxin die Resultate klarer ausfielen. Auch hier haben wir einen recht scharfen Unterschied zwischen intravenöser und subkutaner Injektion. Bei der ersteren hatten wir entweder vollständiges oder durchschnittlich nicht weniger als zehntägiges Überleben des Kaninchens (bei aufeinanderfolgender Einführung hatten wir in diesem Falle kein vollständiges Überleben). *Bei subkutaner Injektion blieben alle Kaninchen am Leben.* Die Kontrollkaninchen erlagen alle nach 3 bis 4 Tagen. Diejenigen, welche eine letale Toxindosis in einem Gemisch mit 0,1 g Chinin bekamen, leben heute schon länger als 10 Monate.

Endlich wurden noch Versuche mit vorheriger Toxin- und darauffolgender Chinineinführung angestellt. Hier sollte das Chinin das schon von den Blutkörperchen gebundene Toxin verdrängen. Die Resultate waren etwas weniger befriedigend als bei ungleichzeitiger Einführung in umgekehrter Reihenfolge, und zwar bei intravenöser Einspritzung überlebten die Versuchskaninchen die Kontrollkaninchen durchschnittlich 3 Tage, und bei subkutaner Einspritzung waren Fälle vollständigen Überlebens weit seltener als bei vorheriger Chinin- mit darauffolgender Toxineinführung. Diese Versuche wurden an 20 Kaninchen durchgeführt.

Mit Rücksicht auf die mit einer letalen Toxindose erhaltenen Resultate erschien es interessant festzustellen, in welchem Maße die hemmende Wirkung des Chinins sich auf eine größere Menge letaler Toxineinheiten erstreckt. Derartige Versuche wurden ebenso wie die oben geschilderten reihenweise mit je vier Tieren angestellt. Injektionen wurden an 50 Kaninchen vorgenommen, wobei das Chinin intravenös, subkutan und in einem Gemisch mit Toxin eingeführt wurde. Die Chinindosis blieb dieselbe, während die Toxindosen zwischen 10 bis 500 Einheiten schwankten. Der Tod des Kontrollkaninchens trat dabei 10 bis 16 Stunden nach der Injektion ein.

Auch diese Versuche zeigten, daß das Chinin überall und immer eine hemmende Wirkung ausübt, wobei mit Steigerung der letalen Toxineinheiten der Einfluß des Chinins bedeutend abnimmt, d. h. wenn wir bei schwachen Dosen bei aufeinanderfolgender Injektion

ein Überleben auf einen Tag hatten (s. höher), so hatten wir in gegebenem Falle ein Überleben auf Stunden (durchschnittlich 4 Stunden). Bei Einführung von einem Gemisch Chinin und Toxin war das Resultat auch bei enormen Mengen letaler Einheiten ein viel deutlicheres als bei aufeinanderfolgenden. Durchschnittlich überlebten die Versuchskaninchen die Kontrolltiere um 16 bis 30 Stunden.

Da das Chinin nur teilweise die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten dem Toxin gegenüber herabsetzt, so kann man diese Tatsache dadurch erklären, daß ein gewisses Prozent des Toxins stets adsorbiert wird. Ist die angewandte Toxinmenge groß, so wird der adsorbierte Anteil mehr als eine Letaldosis betragen, und das Tier geht zugrunde.

Fassen wir diese Resultate zusammen, so bleibt kein Zweifel darüber, daß das Chinin in allen Fällen, wo es angewendet wurde, eine refraktäre Wirkung auf das Diphtherietoxin ausübt, und zwar unabhängig davon, ob vor, gleichzeitig oder nach Einführung des Diphtherietoxins eingespritzt wurde.

Die besten Resultate wurden bei gleichzeitiger Einführung erlangt, was sich dadurch erklärt, daß das Chinin, wie es von zahlreichen Autoren bewiesen ist, schnell aus dem zirkulierenden Blute heraustritt und seine Wirkung sich auf Sekunden beschränkt. *Bei gleichzeitiger und subkutaner Einführung von Chinin und einer letalen Toxindosis erhielten wir vollständiges Überleben der Versuchstiere.*

Da diese Resultate genau mit denen in vitro erhaltenen übereinstimmen, so haben wir dadurch einen neuen Beweis für die Richtigkeit der von *Sbarsky* ausgesprochenen Hypothese über den Zusammenhang zwischen der Adsorption von Eiweißabbauprodukten aus dem Toxin durch Blutkörperchen und der Empfänglichkeit des Tieres gegen das Toxin. *Jegliche von den Blutkörperchen stärker als das Toxin adsorbierte Substanz* (in unserem Falle das Chinin) *wird schon dadurch allein zu einem Antitoxin.*

Auf Grund der erhaltenen Resultate sind wir zu der Ansicht berechtigt, daß zwischen der Menge der im Toxin enthaltenen Eiweißabbauprodukte und seinen toxischen Eigenschaften ein quantitativer Zusammenhang bestehe. In der Tat bedeutet die Bindung der im Toxin enthaltenen Eiweißabbauprodukte schon an und für sich eine Adsorption des Toxins. Weitere Versuche in dieser Richtung werden vielleicht neues Licht auf diese Frage werfen.

Literatur.

1) *B. Sbarsky*, diese Zeitschr. **135**, 21, 1923; **141**, 33, 1923. — 2) *B. Sbarsky* und *D. Michlin*, ebendaselbst **141**, 37, 1923. — 3) *Morgenroth*, Deutsch. med. Wochenschr. **44**, 961 und 988, 1918. — 4) *Halberkann*,

diese Zeitschr. **95**, 24, 1919. — 5) *Schilling* und *Boecker*, Deutsch. med. Wochenschr. **45**, 682, 1919. — 6) *Acton* und *King*, Biochem. Journ. **15**, 53, 1921. — 7) *Rona* und *Bach*, diese Zeitschr. **111**, 166, 1920. — 8) *Rona* und *Bloch*, ebendaselbst **121**, 235, 1921; **128**, 169, 1922. — 9) *Boecker*, ebendaselbst **103**, 63, 1920. — 10) *Cahn* und *Bronner*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **20**, 307, 1919.

Anmerkung bei der Korrektur. Als vorliegende Arbeit schon unter Druck war, wurde uns die Arbeit von *P. Nélis* (C. r. de Biologie, 92, Mai, 1116, 1925) bekannt, welcher von ganz anderen Voraussetzungen ausgehend, und mit einer anderen Tierart (Meerschweinchen) arbeitend, ebenfalls zum Schluß gelangte, daß das Chinin eine hemmende Wirkung auf Diphtherietoxin ausübt.

Über Konservierung in vitro und elektive Giftempfindlichkeit roter Blutkörperchen.

Von

Olaf Laves.

(Aus dem Pharmakologischen Institut zu Göttingen.)

(Eingegangen am 24. Juni 1925.)

Durch eine Reihe von Arbeiten der letzten Zeit (1 bis 28) ist das Verhalten roter Blutkörperchen nach der Entfernung aus dem strömenden Blute mit feineren Methoden erneut studiert worden. Dabei wurde unter anderem erkannt, daß ihre Eigenschaften unter dem Einfluß ihrer künstlich gesetzten Umgebung geändert werden können. Besonderes Interesse boten Beobachtungen von *Heinrich Rhode* (4), aus denen hervorzugehen schien, daß *elektive* Empfindlichkeit für bestimmte Alkaloide willkürlich durch bestimmte Vorbehandlung von Blutzellen hervorgerufen werden könne. Dies ging über die schon länger bekannte Änderung der Resistenz für hämolytische Gifte überhaupt hinaus und versprach bei genauerem Studium einen Hinweis auf Deutungsmöglichkeiten für das Geheimnis der elektiven Alkaloidwirkungen.

Zu diesem Studium war es aber erwünscht, künstliche Bedingungen kennenzulernen, die den *natürlichen* Lebensbedingungen der roten Blutzellen möglichst weit angenähert wären, um gewissermaßen eine feste Basis zu gewinnen, von der aus Richtung und Ausmaß der gesetzten *abnormen* Bedingungen richtig beurteilt werden könnten.

Aus diesen Gründen beschäftigt sich vorliegende Arbeit mit zwei Fragen, die jedoch innerlich verknüpft sind: im ersten Teile werden die bisherigen Mitteilungen über konservierende Flüssigkeiten für rote Blutkörperchen (Blk.) nachgeprüft und erweitert, im zweiten Teile sind Beobachtungen über die Veränderungen der Empfindlichkeit von Blk. gegenüber Alkaloidsalzen der Morphinreihe (Morphin, Methyl- und Äthylmorphin) und dem Chinin geschildert, die unter dem Einfluß von Milieu und Vorbehandlung auftraten und zum Teil durchaus elektiver Art sind.

I. Haltbarkeit von Blutzellen in verschiedenen Lösungen.

Daß das übliche Waschen und Aufschwemmen von Blk. in „physiologischer Kochsalzlösung“ nicht harmlos ist, ist schon lange bekannt[1]).

So verringert sich z. B. nach *Snapper* die Resistenz von Blk., die in isotonischer NaCl-Lösung gewaschen waren, gegenüber Hypotonie im Vergleich zu ungewaschenen und rohrzuckergewaschenen. Zusatz von 0,1 Proz. $CaCl_2$ zur Kochsalzlösung macht die Resistenz gleich derjenigen von nicht gewaschenen Zellen. *Brinkman* erhielt durch Waschen mit einer äquilibrierten Salzlösung Blk., die sogar noch resistenter gegen Hypotonie waren als nicht gewaschene. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 0,7 Proz., $NaHCO_3$ 0,2 Proz., KCl 0,01 Proz., $CaCl_2$. 6 aq. 0,02 Proz. und so viel CO_2, daß die $H^{\cdot}$-Konzentration $0,45 \cdot 10^{-7}$ war. Die Erscheinung der Resistenzvermehrung gegenüber ungewaschenen Blk. erklärt er damit, daß durch das Waschen hämolysefördernde Phosphatide aus der Blk.-Oberfläche mit ausgewaschen werden. Ebenfalls günstig beeinflußt wird die Hypotonieresistenz von Blk. durch Vorbehandlung mit Phosphat oder Sulfat (*Brinkman, Hamburger*, l. c.) und auch Zucker (*Bang* (37). Nach *Rous* und *Turner* (1) hat ein gewisser Zuckergehalt der Lösung eine besonders günstige Wirkung auf die Haltbarkeit der Blk. Sie legten keinen Wert auf die Prüfung der Resistenz gegenüber hypotonischen Lösungen, sondern untersuchten im wesentlichen die Dauer des Ausbleibens der spontanen Hämolyse, ferner die Brauchbarkeit der überlebenden Blk. zur Transfusion bei ausgebluteten Tieren.

Im Anschluß an die genannten Autoren prüfte ich selbst die Haltbarkeit von Blk. in verschiedenen reinen Salz- und Zuckerlösungen, sowie in Salz-Zuckermischungen.

Um möglichst vergleichbare Resultate zu bekommen, war es nötig, die Blk. in Lösungen zu waschen und zu suspendieren, die sowohl untereinander als auch mit dem Serum durchaus isotonisch und isohydrisch waren.

Methodisches.

1. Lösungen.

Blutisotonische Salz- und Zuckerlösungen wurden folgendermaßen hergestellt. Nach den Tabellen von *Landolt-Börnstein* wurden für die einzelnen Salze usw. Kurven für die Gefrierpunktsdepression nach der Konzentration gezeichnet. Dann wurde die Depression mehrerer Proben Rinderserum nach *Beckmann* ermittelt, endlich mit Hilfe der Kurven, aber unter sorgfältiger Nachprüfung des Gefrierpunkts jeder einzelnen Lösung für alle untersuchten Substanzen osmotische Konzentrationen hergestellt, die mit der des Serums übereinstimmen.

Der *Beckmann*sche Apparat wurde lege artis bedient. Der Nullpunkt erwies sich bei zweimaligem Gefrieren von doppelt destilliertem und einfach

[1]) Siehe *Snapper* (9), *Brinkman* (10), *Brinkman* und *van Dam* (11), *Hamburger* (12).

destilliertem Wasser als gleich und konstant. Die Bestimmungen wurden bei herausragendem Faden vorgenommen, die Lösung um wenige Zehntelgrade unterkühlt, mit Eiskristallen geimpft und gleichmäßig mit der Hand gerührt. Während der Gefrierpunkt des Wassers immer der gleiche war, variierte er bei den Lösungen manchmal um $\pm$ 0,005°, einen Betrag, der für den erstrebten Zweck vernachlässigt werden kann. Außerdem stellte sich heraus, daß die gefundenen Depressionen regelmäßig etwa um 0,04° größer waren, als aus den Kurven abzulesen war; da nicht das Präzisionsverfahren angewandt wurde, ist dies nicht weiter erstaunlich. Es kam ja auch nicht auf absolute Werte an, sondern nur darauf, daß der Gefrierpunkt der verschiedenen Lösungen gleich war.

Da die Depressionen einiger untersuchter Rinderseren um 0,58° herum schwankten, wurden sämtliche Lösungen auf Δ = 0,58 $\pm$ 0,005° eingestellt.

Die verwandten Salze und Zucker waren mit Ausnahme des Rohrzuckers Analysenpräparate von *Kahlbaum* und *Merck*. Der Rohrzucker war ein besonders von der Firma Gehe u. Comp., Dresden, hergestelltes Präparat [1]), dessen Kalkfreiheit nachgeprüft und bestätigt wurde.

NaCl und KCl waren bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Die $CaCl_2$- und Na_2SO_4-Lösung wurden durch Verdünnung einer solchen gemacht, deren Salzgehalt vorher durch chemische Analyse quantitativ bestimmt war. Wenn bei der Nachprüfung der Lösungen die Depression nicht ganz der aus den Kurven erwarteten entsprach, wurden sie durch Zufügung von etwas Wasser oder Substanz so verändert, daß ihre Depression gleich der des Serums wurde.

Unter Kontrolle der Lösungen mit Methylrot wurde darauf geachtet, daß das p_H überall gleich war.

In dieser Weise wurden folgende Lösungen hergestellt:

NaCl 0,92 Proz., Δ = 0,585°; KCl 1,19 Proz., Δ = 0,585°; $CaCl_2$ 1,26 Proz., Δ = 0,580°; Na_2SO_4 1,80 Proz., Δ = 0,580°; $NaHCO_3$ 1,4 Proz., Δ = 0,585°; Na-Citrat 3,85 Proz., Δ = 0,585°; Dextrose 5,15 Proz., Δ = 0,580°; Saccharose 9,15 Proz., Δ = 0,580°.

Die Na-Citratlösung entspricht fast vollkommen der von *Rous* und *Turner* (1) angegebenen; sie benutzten eine 3,8proz.

Ferner wurde noch eine Phosphatlösung benutzt, die folgendermaßen bereitet war:

Zunächst wurde eine Lösung von 1,79 Proz. sekundären Phosphats mit 12 aq. und 3,32 Proz. eines primären Na-Phosphatpräparats hergestellt, das mit dem Vermerk: Kristallwassergehalt 4 versehen war, eine Angabe, die sich nachträglich als nicht ganz sicher erwies. Dies Phosphatgemisch wurde dann so lange verdünnt, bis seine Depression Δ = 0,580° war. Dann enthielt 1 Liter Lösung etwa 17,8 g primäres Na-Phosphat . 4 aq. und 9,6 g sekundäres Na-Phosphat . 12 aq. und konnte in bezug auf Phosphor als rund 0,12 mol. geschätzt werden.

Diese Salzzusammensetzung hatte bei der Prüfung mit Methylrot die gleiche Reaktion wie die übrigen Neutralsalz- und Zuckerlösungen,

---

[1]) Der Firma sei an dieser Stelle besonderer Dank für ihre wertvolle Unterstützung gesagt.

die infolge eines geringen CO_2-Gehalts des verwandten destillierten Wassers leicht sauer reagierten. Der erstrebte Zweck völliger Gleichförmigkeit wurde allerdings nicht erreicht, da das Phosphatgemisch natürlich einen viel größeren Vorrat an Säure enthielt als die kohlensäurehaltigen -Lösungen (s. S. 428). In dieser Hinsicht weisen die Versuche noch einen Mangel auf.

Das p_H der benutzten Phosphat- und damit auch der anderen Lösungen läßt sich annäherungsweise bestimmen. Man kann annehmen, daß 10 ccm dieser Lösung bestehen aus 7,75 ccm 0,12 mol. primärer Phosphatlösung und 2,25 ccm 0,12 mol. sekundärer Phosphatlösung. Nach dem bekannten Pufferdiagramm von *Sörensen* (29) würde das einem p_H von 6,3 entsprechen, wenn die Lösung nicht 0,12 mol., sondern $^1/_{15}$, d. h. 0,067 mol. wäre. Konzentrationsunterschiede spielen bei Puffermischungen nur eine ganz geringe Rolle. Vielleicht enthielt aber das primäre Phosphat nicht ganz so viel Kristallwasser, wie anfangs angenommen wurde. Berücksichtigt man dies, so kann man wohl sagen, daß das p_H der Phosphat- und damit auch der anderen Salz- und Zuckerlösungen, die dem Indikator die gleiche Farbe erteilten, etwa 6,0 bis 6,3 betrug. Methylrot zeigte Orangefarbe.

Die Citrat- und Carbonatlösung reagierten natürlich leicht alkalisch.

Als *Salzmischung* wurde in den ersten Versuchen eine Mischung[1]) benutzt, die sich an das Verhältnis der Kationen im Serum anlehnte ohne Bicarbonatpufferung [Zusammenstellung nach *Heubner* im Handbuch der Balneologie von *Dietrich* und *Kaminer* (30)]. Ihre Zusammensetzung war:

1000	ccm	0,92 proz.	NaCl-Lösung,	
38,7	„	1,19 „	KCl-	„
26,6	„	1,26 „	$CaCl_2$-	„

oder in Prozenten ausgedrückt: 0,863 Proz. NaCl; 0,0432 Proz. KCl; 0,0315 Proz. $CaCl_2$. Dies entspricht dem dort angegebenen Verhältnis der Kationen (Na 300, K 20, Ca 10), wenn auch wegen der Isotonie in höheren absoluten Zahlen. In den späteren Versuchen wurde eine Mischung benutzt, deren Salzzusammensetzung der von *Rous* und *Turner* (1) angegebenen entsprach. Letztere enthielt in 1 Liter:

9,2 g NaCl,
0,1 g KCl,
0,1 g $CaCl_2$,
0,05 g $NaHCO_3$.

Es wurde dementsprechend folgende Mischung[2]) hergestellt:

1000	ccm	0,92 proz.	NaCl-Lösung	= 9,2 g	(0,902 Proz.)
8,40	„	1,19 „	KCl- „	= 0,1 g	(0,0098 „)
7,93	„	1,26 „	$CaCl_2$- „	= 0,1 g	(0,0098 „)
3,57	„	1,40 „	$NaHCO_3$ „	= 0,05 g	(0,0049 „)

---

[1]) Später kurz mit M I bezeichnet.

[2]) Im folgenden mit M II bezeichnet.

Das Verhältnis der Salze untereinander ist also dasselbe wie bei *Rous* und *Turner*, nur ist die Lösung im ganzen etwas verdünnter; denn anstatt 1000 sind es 1020 ccm Lösung, in der die betreffenden Salzmengen enthalten sind. Es sei noch gesagt, daß diese Lösung infolge des Bicarbonatzusatzes neutral reagierte.

Von diesen beiden Salzmischungen wurden immer zwei Teile mit einem Teil isotonischer (9,15 proz.) Saccharose- oder (5,15 proz.) Dextroselösung vermischt (M I D, M II D und M I S, M II S).

2. *Waschung und Suspension.*

Verwendet wurde meist Rinderblut, in einigen Versuchen allerdings auch Schweine-, Kaninchen- und Hammelblut.

Rinder-, Schweine- und Hammelblut wurden durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert und dann koliert, Kaninchenblut durch Auffangen in zwei Drittel des Blutvolumens isotonischer (3,85 proz.) Na-Citratlösung am Gerinnen verhindert.

Es wurden immer, mit Ausnahme der Kaninchenblutversuche (s. S. 425), 5 oder 2,5 ccm Blut dreimal in der betreffenden Suspensionsflüssigkeit gewaschen und dann in Meßkolben mit der gleichen Flüssigkeit zu 100 oder 50 ccm aufgefüllt, so daß immer 5 proz. Blutaufschwemmungen resultierten. Ferner wurde bei einigen Versuchen zum Vergleich eine 5 proz. Suspension von ungewaschenem Blut im eigenen Serum hergestellt.

Gearbeitet wurde bei Zimmertemperatur, aufbewahrt wurden die Suspensionen im Eisschrank. Auf größte Sauberkeit wurde Bedacht genommen, ferner die Standkolben mit den Suspensionen immer sorgfältig mit Watte verschlossen, um Bakterienwirkungen nach Möglichkeit auszuschließen.

3. *Volumenbestimmung.*

Von Zeit zu Zeit wurde das Volumen mittels selbst nachtarierter *Hamburger*scher Konohämatokritröhrchen bestimmt.

Dazu wurde 1 ccm Suspension genommen, wenn nicht etwas anderes besonders bemerkt ist. Zentrifugiert wurde bei einer Tourenzahl von 2500 pro Minute so lange, bis sich das Volumen 15 Minuten lang als konstant erwies (etwa 2 Stunden). Lackfarbe der Blk.-Säule erwies sich nicht als beweisend, da das Volumen sich manchmal trotz bereits aufgetretener Lackfarbe noch verringerte. Andererseits wurde unter gewissen Umständen die Blk.-Säule überhaupt nicht oder nur teilweise lackfarben (s. S. 427).

Versuchsprotokolle.

Auf den Tabellen bedeutet 1. Tag immer den Tag, an dem der Versuch angesetzt wurde. Die Zahlen bedeuten das Volumen der in 1 ccm Suspension enthaltenen Blk., ausgedrückt in 10^{-4} ccm. Einklammerung der Zahlen bedeutet leicht gelbliche Verfärbung der über-

stehenden Flüssigkeit. Der Hämolysegrad wurde geschätzt und wie bei *Rhode* in römischen Ziffern ausgedrückt. Es bedeuten:

I: Beginn von Hämolyse eben erkennkar;
II: deutliche, doch mäßige Hämolyse;
III: starke, doch nicht vollständige Hämolyse;
IV: fast klare Lösung;
V: vollkommen klare Lösung;
Ag: Agglutination;
Sed: nicht mehr aufschüttelbare Sedimentierung;
(Sed): mit Mühe aufschüttelbare Sedimentierung.

Ein H bedeutet solchen Fortschritt der Hämolyse, daß Volumenbestimmungen völlig sinnlos gewesen wären.

Die Versuche wurden so gezählt, daß die Zahlen jedesmal eine bestimmte Blk.-Aufschwemmung bedeuten und mit Buchstaben die einzelnen Versuche bezeichnet werden, die mit der betreffenden Suspension gemacht wurden, seien es nun Haltbarkeits- oder Hämolyseversuche.

Vergleich von Rinder- und Schweineblut.

Versuch 1a.

Suspension von Rinder- und Schweine-Blk. in NaCl und Saccharose. Bei Schweine-Blk. starke Agglutination im Zucker. Nach 14 Tagen Rinder-Blk. in Saccharose noch intakt, in NaCl schon stark hämolytisch; die Suspensionen der Schweine-Blk. hatten sich nur wenige Tage gehalten. Nach 21 Tagen Rinder-Blk. in Saccharose: Hämolysegrad I.

Es zeigt sich also, daß Rinder-Blk. sich bedeutend länger halten, wenigstens in NaCl- und Saccharoselösung, als Schweine-Blk. Es folgen daher jetzt einige Versuche mit Rinder- und Kälber-Blk.

Versuche mit Rinder- und Kälber-Blk.

Versuch 2.

Kälber-Blk.-Suspension in NaCl, Na_2SO_4, Dextrose und Serum.

Tabelle I (Versuch 2).

Tag	NaCl	Na_2SO_4	Dextrose	Serum	Tag	NaCl	Na_2SO_4	Dextrose	Serum
2.		170		190	6.	II	I	II	
3.		171	147	188	7.	H	H	150 II	H
4.		170	154	185	8.			H	
5.	192		155 I	180					

Versuch 3a.

Suspension von Rinder-Blk. in NaCl und Phosphat. Phosphatsuspension nach 5 Tagen noch intakt, NaCl-Suspension beginnende Hämolyse.

Versuch 4.

Rinder-Blk.-Suspension in NaCl und Phosphat.

Tabelle II (Versuch 4).

Tag	NaCl	Phosphat
1.	166	165
2.	165	172
4.	174	172
12.	H	

Nach 19 Tagen überstehende Flüssigkeit der Phosphat-Blk. gelblich, Blk. selbst etwas bräunlich verfärbt.

Versuch 5.

Rinder-Blk.-Suspension in NaCl, Phosphat, Saccharose und Dextrose. Die Dextrosesuspension agglutinierte während des Waschens.

Tabelle III (Versuch 5).

Tag	NaCl	Phosphat	Saccharose	Tag	NaCl	Phosphat	Saccharose
2.	192		151	20.		191	Sed I
3.	189	188	142	23.		192	
9.	I			25.		190	
11.	H			28.		190	
17.			(Sed)	36.		(191)	
18.		192	I				

Am 17. Tage Saccharosesuspension so fest sedimentiert, daß sie kaum noch aufzuschütteln war; am 20. Tage nicht mehr aufzuschütteln.

Am 36. Tage Phosphat-Blk. bräunlich verfärbt. Der Versuch wurde deswegen abgebrochen, obwohl noch keine Hämolyse eingetreten war.

Versuch 6.

Suspension von Kälber-Blk. in NaCl, Na_2SO_4, Dextrose, M I D (s. S. 420) und Serum.

Tabelle IV (Versuch 6).

Tag	NaCl	Na_2SO_4	Dextrose	MID	Serum
2.	180	156	190	192	188 I
3.	178	157	186	193	198 I
4.	177	156	177 I	(188)	198 II
5.	174	158	172 I		H
6.	176	157	H	H	
7.	174 II	162 I			
8.	H	H			

Zu diesem Versuch ist zu bemerken, daß schon bei der ersten Volumenbestimmung der Serum-Blk., also am zweiten Tage, ein Teil des in der Kapillare über dem Sediment stehenden Serums hämolytisch war.

Versuch 7.

Rinder-Blk.-Suspension in NaCl, Na_2SO_4, Dextrose, M I D und Serum. In Dextrose sofort Agglutination und Hämolyse.

Tabelle V (Versuch 7).

Tag	NaCl	Na_2SO_4	MID	Serum	Tag	NaCl	Na_2SO_4	MID	Serum
2.	185	164	194	183	6.		168	194 Ag	175
3.			190	185	7.	II			
4.	189	167	192	184	8.	H	171	H	H
5.		167	192	181	9.		H		

M I D-Blk. am sechsten Tage zum Teil in dunklen Klumpen agglutiniert.

Versuch 8a.

Rinder-Blk.-Suspension in NaCl, Na_2SO_4, Phosphat und M II S-Lösung.

Nach 7 Tagen NaCl- und Na_2SO_4-Blk. Hämolysegrad II. Nach 14 Tagen Phosphat-Blk. Hämolysegrad I, Blk. selbst ganz leicht bräunlich. M II S-Blk. noch intakt.

Versuch 9a.

Rinder-Blk.-Suspension in NaCl, Na_2SO_4, und M II S.

Nach 7 Tagen Na_2SO_4 und M II S-Blk. noch intakt, NaCl-Blk. hämolysiert.

Versuch 10.

Kälber-Blk.-Suspension in KCl, Saccharose, M II S und Serum.

Tabelle VI (Versuch 10).

Tag	MIIS	Saccharose	KCl	Serum	Tag	MIIS	Saccharose	KCl	Serum
2.	156	135	167	162	15.		H		
4.	155	118	171	157	18.	155			
5.	155	109	167 I	157	19.	145			
6.	156	107	H	155 I	22.	145			
7.	154	(102)		H	24.	140			
8.	154	(101)			27.	134			
9.	158	(101)			28.	135			
11.	153	(106)			34.	133			
12.	155				39.	134			
13.	160	(92)			56.	H			
14.	154	(98)							

Etwa am 50. Tage trat bei den M II S-Blk. allmählich sich verstärkende Hämolyse auf. Volumenbestimmungen wurden nicht mehr gemacht, da nicht mehr genügend Suspension vorhanden war.

Versuch 11.

Kälber-Blk.-Suspension in M II S, Saccharose, KCl, $CaCl_2$ und Serum.

Tabelle VII (Versuch 11).

Tag	M II S	Saccharose	KCl	$CaCl_2$	Serum
1.	93	76	102		95
2.	91	69	102	100	97
3.	92	(67)	103 I	96	97
4.		(74)	99 I		
6.	92	(65)	102 I	91	98 I
7.	92	(64)	98 II	93	H
8.	94	(65)	H		
9.	97	(61)		91 I	
11.		Sed		82 II	
13.	97			H	
14.	93				
16.	90				
17.	90				
23.	73				

Am 11. Versuchstage Saccharose-Blk. fest sedimentiert, ohne sich aufschütteln zu lassen, keine Hämolyse. Länger als 23 Tage wurde der Versuch nicht fortgesetzt, da durch die dauernden Volumenbestimmungen die Menge der Suspension sich zu stark vermindert hatte. Bis dahin war aber die M II S-Suspension unhämolysiert und gut aufschüttelbar geblieben, ohne Agglutination zu zeigen.

Versuch 12.

Kälber-Blk.-Suspension in M II S, M II D, Saccharose, Dextrose und Serum.

Tabelle VIII (Versuch 12).

Tag	M II S	Saccharose	M II D	Dextrose	Serum
1.		145		162	
2.	168	128 I	(188)	160 I	172
3.	165	127 I	184 I	159 I	175
4.	167	125 II	181 I	157 II	Ag.
5.	(165)	H	H	H	
7.	(164)				
8.	160 I				
9.	150 I				
10.	H				

Bereits am dritten Tage Beginn der Agglutination im Serum.

Bezüglich Volumen kann hier nur M II D- und Dextrosesuspension einerseits und M II S- und Saccharosesuspension andererseits verglichen werden, da die zur Herstellung der Suspensionen benutzten Pipetten verschieden waren. In den anderen Versuchen kam dieser Fehler nicht in Frage.

Versuch 13.

Kälber-Blk.-Suspension in M II S, M II D, Saccharose, Dextrose und Serum.

Tabelle IX (Versuch 13).

Tag	M II S	M II D	Saccharose	Dextrose	Serum
1.	191	194	175	175	
2.	191	197	174	179	197
4.	186	199 I	172 I	172 I	188
5.	188	198 II	166 II	164 II	Ag
6.	186		159 II	140 II	
7.	186	H	144 II	136 II	
8.	188		130 II	148 II	
9.			127 II	152 II	
11.	194				
15.	195		139 II	145 II	
16.			H	H	
21.	189				
26.	185				
41.	H				

Am vierten Tage Beginn der Agglutination im Serum. Am 15. Tage war die Dextrosesuspension braun gefärbt, reagierte gegen Lackmus sauer (Gärung). Vom 26. bis 41. Tage wurden keine Volumenbestimmungen mehr gemacht; in den letzten Tagen trat allmählich fortschreitende Hämolyse ein.

Versuche mit Kaninchen-Blk.

Kaninchenblut, das durch Anschneiden der Ohrvene gewonnen wurde, wurde direkt in isotonischer Na-Citratlösung (s. S. 418) aufgefangen, und zwar 3 Teile Blut in 2 Teilen Citratlösung. Darauf wurde gut umgeschüttelt.

In Versuch 15 und 17 wurden von dieser 60proz. Suspension je 3 ccm, im Versuch 16 eine geringere Menge, mit verschiedenen der oben angegebenen isotonischen Lösungen und Mischungen (S. 418ff.) gewaschen und auf 50 ccm aufgefüllt, so daß sich jeweils eine 3,6proz. Suspension ergab.

Versuch 14.

Kaninchencitratblut wurde mit isotonischer Saccharoselösung (9,15proz. s. S. 418) zu gleichen Teilen vermischt. Es ist dies dasselbe Mischungsverhältnis wie das von *Rous* und *Turner* (1) für ungewaschene Blk. angegebene, nur daß die Lösungen meinen Gefrierpunktsbestimmungen entsprechend etwas andere Konzentration hatten (vgl. S. 418 und 420).

Volumenbestimmungen von 0,2 ccm dieser 30proz. Suspension:

Tabelle X (Versuch 14).

2. Tag	139
14. „	128 II

Nach dem 14. Tage schneller Fortschritt der Hämolyse.

Versuch 15.

Kaninchen-Blk.-Suspension in NaCl, Phosphat, Saccharose und Dextrose.

Tabelle XI (Versuch 15).

Tag	NaCl	Phosphat	Saccharose	Dextrose	Tag	NaCl	Phosphat	Saccharose	Dextrose
1.	110	113	85	90	20.				H
7.	I				21.		115 I		
9.	H	I	II		23.		114 I		
15.		I	H	(Sed)	25.		102 II		
16.		118 I		I	28.		H		
18.		120 I		I					

Am 15. Tage war so feste Sedimentierung der Dextrose-Blk. eingetreten, daß vollständiges Aufschütteln nicht mehr möglich war.

Versuch 16.

Kaninchen-Blk.-Suspension in M II S, M II D, Saccharose und Dextrose.

Tabelle XII (Versuch 16).

Tag	M II S	M II D	Saccharose	Dextrose
2.	52	53	48	48
3.			I	
4.	49	53	37 I	42
5.	47	53	II	40 I
13.	I	I	H	I
19.	III	V		III

Versuch 17.

Kaninchencitratblutsuspension in M II S, M II D, Dextrose und Phosphat. Auch vom Citratblut wurden Volumenbestimmungen gemacht. Es hätten von dieser 60proz. Citratsuspension, um das Volumen mit dem der Salz- und Zuckerlösungen vergleichen zu können, 0,06 ccm (vgl. S. 420 und 425) genommen werden müssen. Da sich eine so geringe Menge nicht fehlerfrei pipettieren ließ, wurden 0,18 ccm genommen. Die Resultate müssen dann durch 3 dividiert werden.

Tabelle XIII (Versuch 17).

Tag	M II S	M II D	Phosphat	Dextrose	Citratblut abgelesen	Citratblut berechnet
2.	79	82	89	72	257	86
4.	76	82	97	65	256	85
6.	73	(82)	(102)	60		
7.					(263)	(88)
8.	(73)	(83)	(102)	57		
9.					264 I	88 I
11.	72 I	85 I	103 I	(55)	H	
12.	72 I	85 I				
14.		H	99 I	(57)		
18.	H					
20.			82 II	(52)		

Am 20. Tage waren die Dextrose-Blk. bräunlich verfärbt, die überstehende Flüssigkeit nur leicht gelblich. Die Phosphatsuspension hatte noch reine Hämoglobinfarbe.

Nebenbefunde.

Es sei hier noch eine Beobachtung nachgetragen, die nicht bei jedem Versuch besonders bemerkt wurde, da sie bei fast allen Versuchen mit Zuckerlösungen gemacht wurde (vgl. S. 420). Es ist das die Erscheinung, daß bei den Volumenbestimmungen der Zucker-Blk. der untere Teil der Blk.-Säule in der Hämatokritkapillare nicht lackfarben wurde, und daß von Tag zu Tag der sich oben befindende lackfarbene Teil kürzer wurde, bis er schließlich ganz verschwand und die ganze Säule dauernd deckfarben blieb.

Man erklärt sich diese Erscheinung wohl am besten so, daß der Zucker allmählich immer mehr Zellen verhärtet, die sich wegen einer größeren Senkungsgeschwindigkeit zu unterst absetzen und nicht mehr die Fähigkeit haben, ihre Form so zu verändern, daß sie ohne Zwischenflüssigkeit direkt an einanderliegen können. Ob es sich dabei um eine Gelatinierung handelt, wie *Handovsky* (14) annimmt, oder um eine andere Art von „Verhärtung", mag unentschieden bleiben, ebenso die Frage, ob die Zuckerwirkung eine durch Auswaschen der Elektrolyte [s. *Gürber* (33)] im Sinne des *Loeb*schen Salzeffekts bedingte ist, oder ob das Zuckermolekül als solches die verfestigende Wirkung ausübt [vgl. auch *Pauli* und *Rona* (49) und *Samec* (50)].

Außerdem sei noch bemerkt, daß manchmal in den reinen Zuckerlösungen beim oder gleich nach dem Waschen Agglutination der Blk. auftrat, die sich aber nach ein- bis zweitägigem Stehen der Suspension meist wieder spontan löste.

Besprechung der Versuche.

Bei der zusammenfassenden Besprechung scheidet man die Versuche 6 und 12 besser aus, da sie abnorm frühe Hämolyse aufweisen. Immerhin stimmen auch die in diesen Versuchen erhobenen Befunde qualitativ überein mit den übrigen.

Zunächst kann man sagen, daß Blk. in NaCl-Lösung etwa das gleiche Volumen haben wie im Serum. Ein gewisses, über längere Zeit sich erstreckendes Nachschrumpfen, wie es im 6. Versuch auftritt, ist schon von *Ege* (31) in ähnlicher Weise beobachtet worden. Das erste Stadium des Schwellens ist von mir nicht beobachtet, da aus technischen Gründen die Volumenbestimmungen immer erst längere Zeit nach der Suspension vorgenommen wurden. Ein anderer Versuch (4) zeigt Nachschwellen. Die Volumenänderungen scheinen also hier etwas schwankend zu sein. Nachschrumpfung wurde außerdem

auch in einigen Versuchen bei Serumsuspensionen beobachtet (Versuch 2, 7, 10, 13). Aber auch dem stehen andere Versuche gegenüber, wo es nicht der Fall war, so besonders Versuch 11.

Die KCl-Blk. (Versuch 10 und 11) haben ein etwa 5 Proz. höheres Volumen als Serum-Blk., was ja auch ganz gut mit den lyotropen Eigenschaften des $K^{\cdot}$-Ions zusammenpaßt.

$CaCl_2$-Blk. hatten in dem 11. Versuch etwa das gleiche Volumen wie Serum-Blk. Auch hier ist ein Nachschrumpfen unverkennbar. Im ganzen kann man sagen, daß die Chloride das Volumen der Blk. nicht wesentlich verändern, wie es ja auch erwartet werden konnte.

In einer Reihe von Versuchen war das Volumen beim ersten Grad von Hämolyse vergrößert und nicht, wie es wahrscheinlicher gewesen wäre, verkleinert. Offenbar ist das der Ausdruck für eine der Auflösung vorausgehende Quellung der Blk.

Die Na_2SO_4-Blk. (Versuch 2, 6, 7) zeigen ein erheblich geringeres Volumen als die Serum- oder NaCl-Blk. ohne nachzuschrumpfen, was auch von *Ege* (31) gefunden wurde.

Auch Saccharose- und Dextrose-Blk. weisen ein deutlich geringeres Volumen auf als Serum- oder Kochsalz-Blk., wie ebenfalls bereits bekannt ist [*Takei* (51), *Handovsky* (14), *Rhode* (4)]. Außerdem zeigen sie ein mehr oder weniger ausgesprochenes, sich auf mehrere Tage erstreckendes Nachschrumpfen, das bedeutend stärker ist als das bei den Salzlösungen beobachtete, so die Saccharose-Blk. im 10. und 11. Versuch, die Dextrose-Blk. im 6. und 17. Versuch. Es ist also festzuhalten, daß sich in dieser Beziehung Zucker- und Sulfat-Blk. deutlich verschieden verhalten.

In der Phosphatlösung ist das Volumen gleich oder vergrößert gegenüber Serum, ähnelt also dem Volumen in Kochsalz. Diese Erscheinung ist sehr auffallend, wenn man bedenkt, daß das Phosphation in der lyotropen Reihe gewöhnlich dem Sulfation benachbart gestellt wird, daß ferner *Rhode* (4) bei der Prüfung von (tertiärem) Ammonphosphat eine stärkere Hämolysehemmung erhielt als durch Sulfat, und daß der Hämolysehemmung gewöhnlich eine Volumenverminderung parallel läuft.

Zur Erklärung dieses Verhaltens kann die Vermutung herangezogen werden, daß in den Phosphatversuchen das Innere der Blk. eine mehr gegen das saure Gebiet hin verschobene Reaktion aufwies als in den übrigen Versuchen. Zur Stütze für diese Vermutung kann eine Beobachtung dienen, die hier noch nachgetragen sei, daß nämlich die Reaktion der abzentrifugierten Flüssigkeit bei den übrigen Versuchen etwa $p_H = 7,0$ entsprach, in den Phosphatversuchen jedoch sauer ($p_H = 6,3$ bis $6,0$) geblieben war (vgl. S. 419). Es sei hier auch noch daran erinnert, daß in verschiedenen Versuchen (4, 5, 8a)

die Phosphat-Blk. gegen Ende etwas bräunlich verfärbt waren, was auf Säurehämatinbildung hinzuweisen scheint. Die nur in sehr geringer Menge vorhandene Kohlensäure des destillierten Wassers (vgl. S. 418, 419) wurde also durch die Blk. viel besser weggepuffert als der reichliche Gehalt an saurem Phosphat.

Es kann also sein, daß eine verfestigende Wirkung des Phosphations und eine auflockernde des $H^{\cdot}$-Ions sich in meinen Versuchen gerade in günstiger Weise ausbalanciert hatten und damit das Ausbleiben einer Volumenverminderung, wie sie bei den Sulfatversuchen stets auftrat, zusammenhängt.

Andererseits ist es nicht unbedingt erforderlich, den $H^{\cdot}$-Ionengehalt des Phosphatgemisches für das auffällige Verhalten der Phosphat-Blk. verantwortlich zu machen; denn es kommen auch sonst noch Fälle vor, in denen das Phosphat, und zwar das neutrale, in seiner Wirkung dem Chlorid viel näher steht als dem Sulfat. So fand z. B. *Tanaka* (32), daß neutrales Phosphat das Eindringen basischer Farbstoffe in Blk. in ähnlicher Weise begünstigt wie Cl' und Br', während Sulfat deutlich hemmend wirkt.

Das Volumen der M II S- und M II D-Blk. differiert nur um wenige Prozent von dem der Serum- und Kochsalz-Blk., meist ist es etwas geringer. Das Volumen wird aber dann längere Zeit ziemlich konstant festgehalten, im 10. Versuch 18 Tage, im 11. Versuch 17 und im 13. Versuch 26 Tage, um sich dann fortschreitend zu verringern.

Hinsichtlich der *Konservierungsfähigkeit* steht zweifellos an erster Stelle das M II-Saccharosegemisch. Es gelang doch, auf diese Weise Blk. bis zu 50 Tagen unhämolysiert zu erhalten. Schließlich trat doch spontane Hämolyse ein, was als Beweis dafür anzusprechen ist, daß nicht etwa Fixierungsvorgänge, also Koagulation oder dergleichen, die Ursache der Konservierung gewesen sind.

Diese Mischung wurde, wie bereits gesagt (S. 417, 419) in Anlehnung an *Rous* und *Turner* hergestellt. Die Autoren haben für Rinder-Blk. keine Lösung angegeben; für Schaf-Blk. geben sie eine Mischung von Ringerlösung und isotonischer Saccharoselösung in solchem Verhältnis an, daß die Endkonzentration der Saccharose 2,8 Proz., für Menschenblut so, daß sie 4,9 Proz. beträgt. In dieser Arbeit wurden der Einfachheit wegen immer 2 Teile M II-Mischung, die ja, wie eingangs erwähnt (S. 420), mit der von *Rous* und *Turner* verwandten Ringerlösung fast identisch ist, mit 1 Teil isotonischer (9,15proz.) Saccharoselösung vermischt. Es ergab das eine Endkonzentration von 3,05 Proz. Der von den Autoren geforderte Gelatinezusatz für Waschflüssigkeit wurde nicht gemacht, da man, wie die Versuche zeigen, auch ganz gut ohne das auskommt. Kaninchen-Blk. halten sich, ebenso wie bei *Rous* und *Turner*, längst nicht so lange, wie die anderer Tierarten (bei *Rous* und *Turner* Schaf, bei mir Rind). Ungewaschenes Kaninchenblut in Citratzuckerlösung hielt sich nicht ganz so lange wie bei *Rous* und *Turner* (9 bis 14 Tage gegenüber 2 bis 3 Wochen). Das hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß es bei meinen Versuchen nicht

wie bei denen der genannten Autoren aus der Carotis oder Aorta, sondern durch Anschneiden der Ohrvene gewonnen war.

Die Lebensfähigkeit in vitro behandelter Blk. erwiesen *Rous* und *Turner* durch Transfusion der Zellen nach etwa 14 Tagen (1). Als Zeichen ihrer Intaktheit konnten sie nach ihren Erfahrungen ansehen, daß sie sich leicht aufschütteln ließen, was z. B. bei reinen Zuckersuspensionen absolut nicht der Fall ist, daß sie frei von Agglutination waren, leicht Sauerstoff aufnahmen und sich bei der *Wassermann*schen Reaktion wie frische Zellen verhielten (Schafblut). Bis auf das Verhalten bei der *Wassermann*schen Reaktion, das nicht untersucht wurde, können diese Angaben in meinen Versuchen vollauf bestätigt werden. Es steht demnach mit Sicherheit fest, daß die Blk. einen wesentlichen Teil ihrer hervorragendsten Eigenschaften erhalten hatten.

Erwähnt sei noch, daß *Sogen* (2) und *Pepper* (3), nach der Methode *Rous* und *Turners* arbeitend (3 Teile Blut, 2 Teile 3,8proz. Natriumcitratlösung, 5 Teile 5,4proz. Dextroselösung), Kaninchen-Blk. mehrere Wochen gehalten haben. *Pepper* konservierte Kaninchen- und Menschenblut, entweder defibriniert oder in der angegebenen Mischung mehrere Wochen im Eisschrank. Durch Vitalfärbung mit Brillant-Cresylblau Darstellung der Retikulation der jugendlichen Blk. Bei Dextrosecitratblut Abnahme der retikulierten Zellen; nach 4 Wochen noch einige vitalfärbbar. Bei defibriniertem Blut nach 3 Wochen Zahl der retikulierten Blk. noch unvermindert. *Sogen* arbeitete nach etwas modifizierter Methode: Entnahme des Blutes aus der Carotis des Kaninchens unter aseptischen Kautelen und Vermischung mit Citrat-Saccharoselösung im Verhältnis 3 : 2 : 5. Darauf Sättigung des Blutes mit O_2 durch 10 Minuten langes Schütteln mit Luft. Aufbewahrung in sterilen Glasgefäßen bei konstanter Temperatur von 20° und Bestimmung des O_2- und CO_2-Gehalts und der O_2-Kapazität mittels des *Barcroft-Haldane*schen Differentialblutgasapparates. Die O_2-Kapazität der Blk. gesunder Kaninchen, die über 40 Tage in vitro konserviert wurden, zeigte während langer Zeit nur geringe Abnahme. Die osmotische Resistenz nahm bis zum 20. Tage zu, um dann wieder etwas abzunehmen.

Ganz anders als in der M II S-Lösung ist das Verhalten der in Saccharose gewaschenen und aufgeschwemmten Blk. Wie aus den Tabellen hervorgeht, ist ihre Haltbarkeit auch größer als die der Kochsalz-Blk. Aber bei ihnen entsteht, wie auch bei *Rous* und *Turner*, meist nach einiger Zeit feste, nicht oder nur schwer aufschüttelbare Sedimentierung (Versuch 5, 11). Ferner trat häufig beim Waschen Agglutination auf, die allerdings nach mehrstündigem Stehen sich wieder löste (s. S. 427), eine Erscheinung, die schon von *Gürber* (33) beschrieben wurde. Erinnert sei in diesem Zusammenhang noch an die erhebliche Volumenschrumpfung und die Unfähigkeit, beim Zentrifugieren eine lackfarbene Säule zu geben (s. S. 427). Ähnlich wirkte die Dextrose, nur waren hier die Ergebnisse nicht ganz so regelmäßig. Wieweit die Befunde sich bei anderen Blutarten bestätigen werden, ist nach *Rous* und *Turner* und besonders den viel älteren Arbeiten

Gürbers (33) sehr fraglich. In einem Versuch (Nr. 7) trat gleich beim Waschen mit Dextrose Agglutination und Hämolyse auf. Man denke dabei an die Angaben früherer Autoren [*Höber* (25), Kap. VII, S. 440 bis 443] über die Permeabilität von Säugetier-Blk. für Glucose. So gibt *Masing* an, daß Rinder-Blk. teilweise für Traubenzucker permeabel sind (34).

Eine sehr gute konservierende Wirkung, die beinahe an die des M II S-Gemisches herankommt, hat auch die Phosphatlösung, nur trat zum Schluß häufig die schon besprochene (S. 428, 429), leicht ins Bräunliche spielende Verfärbung auf, wahrscheinlich eine Wirkung des aus dem H_2PO_4'-Ion leicht abspaltbaren $H^{\cdot}$-Ions. Eine Fixierung im Sinne *Jarischs* (22) kommt hier jedenfalls nicht in Frage, da die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration in meinen Versuchen doch zu gering dazu ist. Auch sprechen positiv ausfallende Hypotonie- und Alkaloidhämolyseversuche dagegen (vgl. S. 434 bis 439).

Bei den übrigen Salzlösungen hätte man nach *Hamburgers* (12) Versuchen über die Hypotonieresistenz erwarten dürfen, daß Na_2SO_4 die Blk. besser konservieren würde als NaCl. Das ist aber anscheinend nur in geringem Grade der Fall (Versuch 7 und 9a). Dem stehen Versuch 2 (und 6) ohne Verbesserung der Haltbarkeit gegenüber.

Über KCl und $CaCl_2$ liegt nur ein Versuch (11) vor. Hier war die durch $CaCl_2$ erzielte Haltbarkeit größer als die in NaCl-Lösung und auch größer als die im allgemeinen durch NaCl erzielte.

II. Hämolyseversuche.

1. *Morphinalkaloide.*

Methodisches.

Die Alkaloidlösungen wurden in Anlehnung an *Rhode* (4) hergestellt. Die Konzentration der einzelnen Alkaloide sollte 4 Proz. betragen, ein von *Rhode* als günstig ausgeprobter Wert. Nun beträgt die isotonische Konzentration bei den Chloriden der verwandten Alkaloide etwa 6 Proz., bei den Sulfaten etwa 8 Proz.; geringfügige Abweichungen der osmotischen Konzentration aber sind für die Hämolyse bedeutungslos (*Rhode*). Daher wurden jeweils 4proz. Lösungen der Chloride in einer Mischung von einem Drittel isotonischer Salz- oder Zuckerlösung und zwei Dritteln Wasser, bzw. eine 4proz. Lösung des betreffenden Sulfats in einer Mischung, die aus gleichen Teilen isotonischer Salz- oder Zuckerlösung und Wasser bestand, hergestellt. Es erscheint auf den ersten Blick nicht ganz korrekt, bei Morphinchlorid und Morphinsulfat Lösungen von gleichen Gewichtsprozenten zu vergleichen, da das Sulfatäquivalent größer ist als das Chloridäquivalent. Durch den geringeren relativen Kristallwassergehalt des Sulfats gleicht sich der Unterschied aber fast genau aus (vgl. *Rhode*, l. c., S. 560). In dieser Mischweise wurden Lösungen hergestellt von Morphinchlorid in Kochsalz und Phosphat, von Äthylmorphinchlorid (Dionin) in Kochsalz, Rohrzucker und Phosphat, von Morphinsulfat in Natriumsulfat, von Codeinphosphat in Phosphat und Kochsalz und von Codeinchlorid in

Kochsalz und Phosphat. Die Lösung des Codeinchlorids wurde durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Salzsäure zu feingepulverter Codeinbase selbst hergestellt, und zwar in der Konzentration von 3,2 Proz. reiner Base. Dies entspricht einer Konzentration von 4 Proz. Codeinchlorid mit 2 Mol. Wasser, wie sie von *Rhode* benutzt wurde. Die Reaktion, die mit Methylrot geprüft wurde, war die gleiche wie bei allen anderen (vgl. unten) $p_H = 6{,}0$ bis 6,3.

Die Codeinphosphatlösung wurde zu 4,6 Proz. gewählt, was dem gleichen Gehalt an Codeinbase entspricht. Zur Lösung diente ein Gemisch von einem Drittel isotonischer Phosphat- oder Kochsalzlösung und zwei Dritteln Wasser.

Da sämtliche Salze sauer reagierten, mußten verschiedene Alkaloidlösungen noch neutralisiert werden. Es war das erforderlich bei den Lösungen von Morphinchlorid und Dionin in Kochsalz und Saccharose, Morphinsulfat in Natriumsulfat und Codeinphosphat in Natriumphosphat und -chlorid. Nicht nötig war es, bei den Lösungen der Alkaloidchloride in Phosphat, da hier die Pufferung ausreichte, die Säure abzustumpfen. Bei der Lösung von Codeinphosphat in Phosphat war es deswegen erforderlich, weil Codeinphosphat als primäres Salz der Phosphorsäure besonders stark sauer reagierte. Die Neutralisierung erfolgte durch Zufügung von isotonischer $NaHCO_3$-Lösung so lange, bis die Lösungen mit der reinen Phosphatlösung (vgl. oben S. 419) von $p_H = 6{,}0$ bis 6,3 gleiche Färbung unter Zusatz von Methylrot aufwiesen. Für 50 ccm Lösung wurden 1 bis 2 ccm Bicarbonat gebraucht. Ganz genau kommt es auf die zugesetzte Bicarbonatmenge nicht an, da die Alkaloidsalze als Salze bloß mittelstarker Basen selbst puffernde Eigenschaften besitzen.

Die Alkaloidlösungen waren teilweise übersättigt. Wenn während des Versuchs etwas von den betreffenden Stoffen ausfiel, wurde er nicht fortgesetzt.

Stets wurden zu 2 oder 2,5 ccm der zu prüfenden Lösung 0,2 oder 0,25 ccm der 5proz. Blk.-Suspension zugesetzt. Die Reagenzgläser mit den Aufschwemmungen wurden teils bei Zimmertemperatur belassen, teils in den Thermostaten (37°) gebracht und von Zeit zu Zeit der Hämolysegrad geschätzt.

Versuchsprotokolle.

In den Tabellen XIV bis XXII bedeuten die in der obersten wagerechten Zeile stehenden Angaben die geprüften Giftlösungen, die darunter stehenden Angaben die Wasch- und Suspensionsflüssigkeiten der jeweils benutzten Blk. Die *Menge* dieser Flüssigkeiten betrug in der Gesamtmischung nur ein Zehntel, so daß für das „*Milieu*" die Angaben der *ersten* Zeile maßgebend sind, und nur für die *Vorbehandlung* die der zweiten. Die angegebene Zeit gilt vom Augenblick der Zufügung der Blk.-Suspension zur Giftlösung.

Es bedeuten: MoCl: Morphinchlorid; Di: Äthylmorphinchlorid (Dionin); CoCl: Codeinchlorid; Mo Sulf: Morphinsulfat; Co Ph: Codeinphosphat; MoCl + Ph: eine Lösung von MoCl in Natriumphosphat in oben angegebenem Verhältnis usf. Über Hämolysebezeichnungen vgl. oben S. 421. Ein Doppelstrich (=) bedeutet Ausfallen von Substanz.

Versuch 1b[1]).

Vergleich von Rinder- und Schweineblut am Tage der Aufschwemmung.

Tabelle XIV (Versuch 1b).

Zeit	Rinderblut				Schweineblut			
	MoCl + Cl		Di + Cl		MoCl + Cl		Di + Cl	
	NaCl	Sacch.	NaCl	Sacch.	NaCl	Sacch.	NaCl	Sacch.
$^1/_2$h			II				II	
1			V	0	0		V	
$1^1/_2$				I	II			
$2^1/_2$	0			II	V			
$3^1/_2$	V			II				0
6				II				I
$16^1/_2$		0		II				I
19		I		II		0		I
42		I		II—III		I		I—II

Man sieht zunächst eine viel größere Resistenz der Zucker-Blk. als der NaCl-Blk. Dies war eine der Hauptbeobachtungen *Rhodes*. Auch geht die Hämolyse, nachdem sie einmal eingesetzt hat, bei Saccharose-Blk. sehr viel langsamer vor sich als bei NaCl-Blk. Ferner sieht man, daß die Schutzwirkung des Zuckers bei Schweine-Blk. eine größere ist als bei Rinder-Blk.

Bemerkenswert ist, daß kein strenger Parallelismus besteht, sondern die Blk. jeder Tierart durch jede Art von Milieu in ihrer relativen Empfindlichkeit gegenüber den beiden Alkaloiden quantitativ verschieden abgestimmt werden.

Versuch 3b.

1 Tag nach der Aufschwemmung.

Tabelle XV (Versuch 3b).

Zeit	MoCl + Cl NaCl	MoCl + Ph NaCl	Di + Cl NaCl	Di + Ph NaCl
$^1/_4$h			V	III
$^1/_2$	0	0		III
$2^1/_2$	II	I		V
3	III			
5	V			

Aus der Tabelle XV geht erstens hervor, daß, wie erwartet, die in NaCl aufgelösten Alkaloide stärker wirksam sind als die in Phosphat aufgelösten [vgl. *Rhode* (4), S. 565 über Ammoniumphosphat und *Rhode* (35), S. 186 über Codeinphosphat], und zweitens, daß Dionin im ganzen wirksamer ist als Morphin, was sich ja auch schon auf Tabelle XIV (Versuch 1b) gezeigt hat.

[1]) Über Versuchsbenennung vgl. S. 421.

Versuch 8b.

1 Tag nach der Aufschwemmung.

Tabelle XVI
(Versuch 8b).

Zeit	MoCl + Cl		CoCl + Cl		Di + Cl		MoCl + Ph		Di + Ph		CoPh + Ph	
	NaCl	Ph	NaCl	Ph	NaCl	Ph	NaCl	Ph	NaCl	Ph	NaCl	Ph
5m				0		III				0		
10	0		0	III	0	V				III		
15	II		II	V	III					V		
20	III		III		IV							
25	IV	0	IV		V				0			
1h	V	V	V					0	II			
2							0	II	II–III			
3							II	V	III			0
4							II–III		III			II
6							III		III			V
8							III		IV		0	
10							III		V		I	
24							IV				V	

Einerseits schützt die Anwesenheit von Phosphationen in der Giftlösung die Blk. vor Hämolyse, andererseits macht Vorbehandlung der Blk. mit Phosphatlösung dieselben sehr viel empfindlicher gegen die Alkaloide. Nur gegen Morphinchlorid in Kochsalzlösung sind die phosphatgewaschenen Blk. resistenter als die chloridgewaschenen.

Versuch 8c.

2 Tage nach der Aufschwemmung.

Tabelle XVII
(Versuch 8c).

Zeit	MoCl + Cl			MoSulf. + Sulf.	
	NaCl	Ph	Sulf.	NaCl	Sulf.
3/4h	II	I	0		
1	III	II	I		
1 1/4	V	III	II		
1 1/2		V	III		
1 3/4			V		
16				0	
17				I	
24				I	0

Der Versuch zeigt, daß Sulfationen die Resistenz der Blk. gegen Morphin erhöhen, sowohl bei der Vorbehandlung als auch besonders bei gleichzeitiger Einwirkung mit dem Gift zusammen.

Versuch 8d.

3 Tage nach der Aufschwemmung.

Tabelle XVIII (Versuch 8d).

Zeit	CoCl + Cl			Di + Cl		
	NaCl	Ph	Sulf.	NaCl	Ph	Sulf.
5 m	0	V	0	0	V	0
15	II		I—II	II		III
20	III		II	III		V
25	V		III	V		
30			V			

Der Versuch zeigt den Einfluß des Sulfats beim Waschen auf Codeinchlorid- und Dioninhämolyse. Er ist keineswegs einheitlich.

Bei Versuch 8c und d erweist sich bezüglich Phosphat-Blk. die Verwandtschaft zwischen Codein und Dionin gegenüber Morphin, bez. Sulfat von Morphin und Codein gegenüber Dionin. Durch Phosphat werden die Blk. codein- und dioninempfindlich, durch Sulfat dioninempfindlich.

Versuch 9b.

1 Tag nach der Aufschwemmung.

Tabelle XIX (Versuch 9b).

Zeit	MoCl + Cl		CoCl + Cl		Di + Cl	
	NaCl	Ph	NaCl	Ph	NaCl	Ph
5 m				III		II
10				V		III
25					0	V
40					II	
50					III	
1h			0		V	
1½	0	0	I			
2	I	I	III			
2½	II		V			

Es zeigt sich bei diesem Versuch wieder eine starke Beschleunigung der Codein- und Dioninhämolyse bei Phosphat-Blk., und zwar ist sie bei Codein erheblich stärker als bei Dionin, so daß bei diesem Versuch dieselbe Codeinlösung, die auf Kochsalz-Blk. schwächer wirkt als Dionin, auf Phosphat-Blk. stärker als dieses wirkt. In Morphinchlorid beginnt die Hämolyse zur selben Zeit bei Kochsalz- und Phosphat-Blk.

In Versuch 9c (Tabelle XX) (1 Tag nach Aufschwemmung) wurde nochmals festgestellt, daß Codeinphosphat auf Phosphat-Blk. stärker wirkt als auf Kochsalz-Blk.

Tabelle XX (Versuch 9c).

Zeit	CoPh + Ph	
	NaCl	Ph
15h	0	I
18	0	II

Versuch 9d.

2 Tage nach der Aufschwemmung.

Tabelle XXI (Versuch 9d).

Zeit	MoCl + Cl			CoCl + Cl		Di + Cl		
	NaCl	Pb	Sulf.	NaCl	Ph	NaCl	Ph	Sulf.
10m					II		II	
20					III		III	
30					V		IV	
40				0		0	V	0
$1^1/_4$h				I		I		I
$1^1/_2$				II		II		III
2				III		III		V
$2^1/_2$	0	0	0	IV		V		
3	II	II	I	V				
$3^1/_2$	III	III	II					
6	V	V	II–III					
15			III					

Der Versuch weist wiederum die verstärkte Hämolyse von Phosphat-Blk. in Codein- und Dioninlösung gegenüber den NaCl-Blk. auf, während bei Morphinchlorid diesmal wieder überhaupt kein Unterschied zu bemerken ist (vgl. Versuch 9b). Außerdem ist deutlich erkennbar verminderte Hämolyse von Sulfat-Blk. durch Morphin und eine verstärkte durch Dionin.

Versuch 9e.

6 Tage nach der Aufschwemmung. Thermostat (37°).

Tabelle XXII (Versuch 9e).

Zeit	MoCl + Cl		
	M II S	Ph	Sulf.
1h	III	V	IV
$1^1/_4$	IV		V
1	V		

Außer der schon oben beobachteten größeren Resistenz von Sulfat-Blk. gegenüber Phosphat-Blk. zeigt dieser Versuch noch, daß am resistentesten, wenigstens gegen Morphin, zweifellos die M II S-Blk. sind.

Versuch 18.

Rinder-Blk. in Saccharose.

a) 1 Tag nach der Aufschwemmung.

Tabelle XXIII (Versuch 18a).

Zeit	Di + Cl	Di + Sacch.
2h	II	0
8	IV	0

b) 2 Tage nach der Aufschwemmung.

Tabelle XXIV (Versuch 18b).

Zeit	Di + Cl	Di + Sacch.	Zeit	Di + Cl	Di + Sacch.
9h	0		37h	II	II
24	I	0	48	V	III
31	I	I			

Beim Vergleich von Versuch 18a und 18b sieht man, daß der Wirkungsunterschied von Dioninlösung in Kochsalz und einer solchen in Saccharose auf saccharosegewaschene Blk. sich im Laufe eines Tages ziemlich stark ausgleicht. Ferner ergeben die Versuche, daß die Resistenz von Saccharose-Blk. gegen Dionin, sowohl in NaCl- als auch in Saccharoselösung, mit der Zeit zunimmt.

Versuch 8e (Tabelle XXV).

Vergleichsversuch mit einer 8 Tage alten M II S-Suspension und frischem, ungewaschenem Blut. Von dem Blute wurde das gleiche Volumen zur Giftlösung hinzugesetzt wie von der (5proz.) Suspension. Es befanden sich also in gleicher Menge Giftlösung 20mal so viel Blk. bei dem Versuch mit ungewaschenen Blk. wie bei dem M II S-Versuch.

Tabelle XXV (Versuch 8e).

	M II S-Blk.							Reines Blut						
Zeit	MoCl + Cl	MoCl + Ph	MoSulf. + Sulf.	CoCl + Cl	CoPh + Cl	Di + Cl	Di + Ph	MoCl + Cl	MoCl + Ph	MoSulf. + Sulf.	CoCl + Cl	CoPh + Cl	Di + Cl	Di + Ph
15m				0		I					III		V	
25				I		II					V			
30				II		III								
35				III		V		0						
45				V				I						0
55								II						I
80								III						II
90	0							III				0		II
105	II							V				I		II
125	III											I		II
135	V						0					I		II
3h							I					II		II
4							I		I			II		II–III
5		0					I		II			II		II–III
7		I			0		I		II			II		II–III
23		I			I		II		II	I		II–III		V
26		=			I		III		II	I		II–III		
29			0		I		V		II	I		III		

Auch hier tritt wieder bei Ersatz eines Teiles oder aller Cl′-Ionen der Alkaloidlösung durch Phosphat- oder Sulfationen eine deutliche Hämolysehemmung ein. Ferner sieht man, daß die 8 Tage alten, in M II S aufbewahrten Blk. etwas widerstandsfähiger sind als ganz frische, unbehandelte.

Es sei hier noch die Beobachtung angefügt, daß sich die Morphinhämolysate nach einiger Zeit immer etwas oliv-bräunlich verfärbten.

2. *Chininversuche.*

Versuch 9f.

Da nach *Friede* (36) eine 1proz. Lösung des neutralen Chininchlorids hämolytisch wirkt, wurde der Versuch mit einer 1proz. Lösung dieses Salzes angestellt. Das Salz hat die Zusammensetzung:

$$C_{20}H_{24}N_2O_2HCl \,.\, 2\,aq. = 396{,}5.$$

Entsprechend den von *Rhode* (4) gemachten Annahmen (vgl. S. 431) müßte eine blutisotonische Lösung des Salzes etwa 6proz. sein, wenn das Salz überhaupt in so hohem Prozentsatz wasserlöslich wäre. Es wurde dementsprechend eine 1proz. Lösung des Chininchlorids in einer Mischung von $^5/_6$ isotonischer NaCl-Lösung und $^1/_6$ Wasser benutzt.

Tabelle XXVI (Versuch 9f).

Zeit	Chininchlorid + NaCl			
	M II S	NaCl	Ph	Sulf.
5m			II	=
10			III	
15	0	0	V	
1h	II	II		
$1^3/_4$	III	III		
17	V	V		

Der Versuch war 3 Tage nach der Aufschwemmung der Blk. angestellt, Versuchsanordnung die gleiche wie bei den vorhergehenden Versuchen.

Der Versuch zeigt stark beschleunigte Hämolyse der Phosphat-Blk.

In den folgenden beiden Versuchen sollte die recht unwahrscheinlich klingende Angabe von *Friede* (36) geprüft werden, daß Chininsulfat in Verdünnung von 1 : 7000 Hammel-Blk. etwa ebenso stark hämolysiere wie neutrales Chininchlorid in der Verdünnung von 1 : 100. Außerdem wurden noch zwei Lösungen untersucht, die Chininchlorid und Chininsulfat in der Verdünnung von 1 : 500 in isotonischer NaCl-Lösung enthielten.

Versuch 19a.

Einfache 5proz. Suspension von Hammelblut in NaCl-Lösung, ohne daß das Blut vorher gewaschen oder das Serum abzentrifugiert wäre. Thermostat (37°).

Tabelle XXVII (Versuch 19a).

Zeit	ChinCl $^1/_{100}$	ChinSulf. $^1/_{7000}$	ChinCl $^1/_{500}$	ChinSulf. $^1/_{500}$
3h	III	0	0	0
17	koag. *)	0	III	III

*) Hämoglobinfarbe war verschwunden, dichter, flockiger, grauer Niederschlag.

Versuch 19b.

2 Tage nach Waschung und Aufschwemmung in NaCl-Lösung. Der Versuch ergibt das gleiche Bild wie der letzte.

Versuch 19a und b zeigen etwa gleiche Wirkung des Sulfats und Chlorids, was wohl auch zu erwarten war, da die wenigen Sulfationen bei dem starken Überwiegen der Chloridionen im Lösungsmittel wohl kaum zur Geltung kommen dürften. Die Chininsulfatlösung von 1 : 7000 zeigt überhaupt keine Hämolyse, während die 1 proz. Chininchloridlösung bereits nach 3 Stunden starke Hämolyse bewirkt hat. Die oben erwähnte Angabe *Friedes* konnte also nicht bestätigt werden.

3. *Hypotonieversuche.*

Da die Alkaloidversuche an den Phosphat-Blk. so überraschende Resultate ergaben, wurde noch ein Hypotoniehämolyseversuch angestellt.

Versuch 8f.

3 Tage nach der Aufschwemmung. Durch Hinzufügen vom gleichen oder halben Volumen Wasser zur Suspension in blutisotonischer Lösung wurde dieselbe hypotonisch gemacht:

Tabelle XXVIII (Versuch 8f.)

Zeit	1/2 isotonisch				2/3 isotonisch		
	M II S	NaCl	Ph	Sulf.	M II S	NaCl	Ph
5 m	V	V	V	0	0	III	0
1 1/2 h				II	I	III	II
17				III	I	V	II

Es ordnen sich demnach die einzelnen Lösungen im Sinne der Resistenzerhöhung nach der Reihe:

$$NaCl < Phosphat < M\,II\,S < Na_2SO_4.$$

Versuch 1c.

3 Tage nach der Aufschwemmung. Saccharose-Blk. hämolysierten nicht bei 20facher Verdünnung der Suspension mit Wasser. Bei noch stärkerer Verdünnung trat Hämolyse ein. Auch *Bang* (37) fand bei Saccharose-Blk. eine mit der Zeit zunehmende Hemmung der Hypotoniehämolyse. Saccharose-Blk. hämolysierten bei ihm nach 16stündigem Stehen erst in 1,6proz. Rohrzuckerlösung. Das wäre also etwa bei sechsfacher Verdünnung der isotonischen Konzentration.

Besprechung der Versuche.

Mit Ausnahme von Versuch 1b und 19a und b sind alle Versuche über Hämolyse mit Rinder-Blk. gemacht.

Die geschilderten Befunde erweitern das bereits von *Rhode* (4) beigebrachte Material über die Variationen der Empfindlichkeit von roten Blk. für Alkaloide mit Änderungen des Milieus und der Vorbehandlung.

Man darf voraussetzen, daß mehrmalige Waschung der Blk. mit bestimmten Salzen, Sacchariden oder Mischungen zum Austausch eines Teiles der in ihnen enthaltenen Kristalloide gegen die Bestandteile des Milieus führt [vgl. *Gürber* (38) und andere Autoren, von denen hier *Koeppe* (39), *Hamburger* (40), *Wiechmann* (41), *Ege* (31), *Siebeck* (42) und *Gollwitzer-Meier* (43) erwähnt seien; vgl. auch *Höber*[1])].

In meinen Versuchen zeigt sich, daß die Waschung nicht nur entschiedenere, sondern auch qualitativ ganz andersartige Beeinflussung der Empfindlichkeit der Blk. herbeizuführen vermag als bloße Aufschwemmung in denselben Lösungen.

Man darf annehmen, daß die Aufschwemmung zu prinzipiell analogen Austauschvorgängen führt wie die Waschung, daß sie sich jedoch mehr auf oberflächlichere Schichten der Blk. und auf ein geringeres Ausmaß beschränken; denn bei der Waschung pflegt eine längere und auch viel innigere Berührung mit der umgebenden Flüssigkeit zu erfolgen als bei der bloßen Aufschwemmung. Somit ergibt sich wiederum, wie schon bei *Rhode* (4) (S. 568), die Nötigung zur Unterscheidung zweier Teilvorgänge bei der Alkaloidhämolyse: das *Einwandern* der Base und die durch sie im Innern gesetzte *Veränderung*.

Daß Zucker und Sulfat die Hämolyse durch Alkaloide zu hemmen vermögen, ist bekannt [*Rhode* (4), *Luger* (6), *Hiruma* (5)]. Andererseits ist auch bekannt, daß Sulfat die Saponinhämolyse befördert oder mindestens nicht hemmt [vgl. *Port* (18), *Miculicich* (19), *Höber* und *Nast* (17), *Handovsky* (14)]. Es ist nun bemerkenswert, daß die hemmende Wirkung der Sulfatwaschung im Vergleich zur Chloridwaschung in meinen Versuchen nur gegenüber dem Morphin und Codein auftrat, beim Dionin dagegen umgekehrt in eine Begünstigung umschlug (Tabelle XVIII und XXI).

Prinzipiell ähnliche Verhältnisse scheinen beim Phosphat vorzuliegen, obwohl hier die Beurteilung wesentlich schwieriger ist; denn der Faktor einer Verschiebung der Wasserstoffzahl im Innern der Blk. spielt hier viel stärker hinein (vgl. S. 428f.). Dennoch ist auch hier in höchstem Grade bemerkenswert, daß die Waschung in Phosphat die Empfindlichkeit der Blk. für Codein und Dionin im Vergleich zu Chlorid erheblich steigerte, für Morphin dagegen eher herabsetzte. Am auffälligsten liegen die Verhältnisse im Versuch 8b.

Die Empfindlichkeit der Phosphat-Blk. für Hypotonie war geringer als die der Kochsalz-Blk., trotz der etwas saureren Reaktion, die ja bekanntlich die Hypotoniehämolyse verstärkt, vgl. *Haffner* (44). Um besonders labil gewordene Blk. handelte es sich also nicht. Vgl. auch die Lebensdauerversuche S. 431.

---

[1]) *Höber* (25), S. 439 und 443ff.

Mehrere Befunde in diesen Versuchen sprechen also dafür, daß die elektive Giftempfindlichkeit der Zellen für Alkaloide mit ihrem Mineralgehalt in Zusammenhang gebracht werden kann. [Vgl. dazu *Höber* (25), S. 592ff.]

Wie bereits *Rhode* ausführte, ist die hämolytische Wirkung der Alkaloide wahrscheinlich vorwiegend davon abhängig, wie sie in die Blk. eindringen, sei es auf Grund spezifischer Permeabilitätsverhältnisse (*Rhode*), oder auf Grund bestimmter Endgleichgewichte, die nach *Tanaka* (32) in verschiedenen Lösungen verschieden sind.

Aus mehreren Versuchen geht hervor, daß Ersatz von Chlorid durch Phosphat in der Außenflüssigkeit (Milieu) die Wirkung, und zwar vermutlich das Eindringen der Alkaloide, erheblich abschwächt, besonders deutlich bei dem phosphatreichsten Codeinversuch (Tabelle XVI, letzte Spalte). Es ist also zu abstrahieren, daß trotz der leicht sauren Reaktion das Phosphat die Permeabilität der oberflächlicheren Schichten vermindert. Andererseits steigert Phosphat nach dem Eindringen, d. h. an den damit gewaschenen Blk. die Empfindlichkeit für Codein und Dionin. Man wird das Bedürfnis empfinden, diese in gewissem Sinne gegensätzliche Wirkung des Phosphats (oberflächlich „verdichtend", im Innern „auflockernd") auf verschiedene Momente zurückzuführen. Vielleicht spielt ebenso wie für das Verhalten des Volumens der Blk. (s. S. 428) eine nach dem Eindringen ins Innere gesetzte Verschiebung der Reaktion nach dem sauren Gebiet hin eine mitbestimmende Rolle.

Mit solcher Reaktionsverschiebung ließe sich auch das verschiedenartige Verhalten gegenüber Morphin einerseits, Codein und Dionin andererseits in einen logischen Zusammenhang bringen, wenn man bedenkt, daß Morphin mit einer unbesetzten Phenolgruppe eine deutlich saurere Verbindung darstellt als die beiden anderen Alkaloide. Zur Fixation der basischeren Substanzen Codein und Dionin könnte die Neigung in sauren Blk. größer sein als zu der des Morphins.

Diese Auffassung würde allerdings in einem gewissen Gegensatz zu Befunden von *Bethe* (45, 46) stehen, der feststellte, daß saure oder künstlich angesäuerte Zellen nur Säurefarbstoffe speichern und keine basischen. Es wird das schließlich davon abhängen, ob der fixierende Zellbestandteil von einer zugesetzten ein- oder mehrbasischen Säure das $H^{\cdot}$-Ion aufnimmt und dadurch zum Kation wird, oder ob er durch Anlagerung des Anions mehr sauren (elektronegativen) Charakter annimmt[1]).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist durch einen Befund von *Tanaka* (32) gegeben. Danach wird die Aufnahme von Säurefarbstoffen in Blk. durch Salze in umgekehrtem Sinne beeinflußt wie die

[1]) Vgl. z. B. *Gabbe* (47) über verschieden starke Adsorption von Anionen verschiedener Säuren.

von basischen Farbstoffen. Es könnte also das etwas saurere Morphin eine ähnliche „Umkehr der Ionenreihe“ hervorgerufen haben wie bei *Tanaka* die Säurefarbstoffe.

Bei dieser Betrachtung soll freilich keineswegs verkannt werden, daß es sich nur um einen Teil der bei den Erscheinungen beteiligten Momente handeln kann. Denn bei dem Sulfat wurden ja prinzipiell analoge, wenn auch quantitativ zurücktretende Verschiebungen der Empfindlichkeit für die einzelnen Alkaloide konstatiert. Eine Möglichkeit zu einer einfachen Deutung vermag ich in diesem Falle nicht zu erblicken.

Eine analoge Beobachtung über Empfindlichkeitsänderungen für verschiedene Alkaloide hatte bereits *Rhode* (4) (Versuch 3, S. 563) gemacht, als er Kochsalz- und Rohrzucker-Blk. verglich. Eine Wiederholung dieses Versuchs (Versuch 1b, S. 433) brachte mir allerdings keine Bestätigung; im Gegensatz zu *Rhodes* Befund erwies sich Dionin gegenüber Morphin sowohl in Kochsalz- wie in Rohrzuckerlösung als stärker hämolytisch. Die Verhältnisse können also noch nicht als endgültig geklärt angesehen werden. Es scheint, daß noch Momente in Frage kommen, die nicht zu übersehen und zu beherrschen sind.

Die Resistenzsteigerung der Blk. durch Zucker, besonders Saccharose, scheint einen eigenen Charakter zu besitzen, vgl. *Miculicich* (19), *Handovsky* (14), *Höber* und *Memmesheimer* (48). Nach den Beobachtungen, die bereits oben (S. 428, 430f.) diskutiert wurden, hat man es bei der Behandlung mit Rohrzucker doch mit einer viel eingreifenderen Veränderung in der Struktur der Blk. zu tun als bei der Behandlung mit Sulfat oder Phosphat, wie am deutlichsten aus dem Verhalten beim Zentrifugieren hervorging (vgl. oben S. 427).

Erwähnt sei hier noch, daß *Luger* (6) eine Verzögerung der Chininhämolyse durch Dextrose fand. Nach *Höber* und *Memmesheimer* (48) ist die Aufnahme von Farbstoffbasen in Saccharose-Blk. vermindert gegenüber NaCl-Blk., nach *Hiruma* (5) die von Rhodanid und Salicylat, nach *Tanaka* (32) die von Farbstoffsäuren nicht nur nicht vermindert, sondern im Gegenteil vergrößert.

Trotz mancher Unregelmäßigkeiten ist das nunmehr vorliegende Material doch schon so groß und auf hinreichend exaktem Wege gewonnen, daß die Möglichkeit willkürlicher Erzeugung elektiver Alkaloidempfindlichkeit nicht mehr in Frage gestellt werden kann. Wieweit diese willkürlich gesetzten Veränderungen als vereinfachte Vorbilder der im Organismus gegebenen Bedingungen betrachtet werden können, mag offen bleiben; doch darf darauf hingewiesen werden, daß viele Erfahrungen dafür sprechen, daß sich die einzelnen Zellenarten sehr deutlich durch ihren Gehalt an mineralischen Stoffen unterscheiden.

Ein Wort verdient in diesem Zusammenhange noch der in Versuch 9e erhobene Befund. In diesem Versuche waren die Blk. mit der Mischung gewaschen, die sie in besonders hohem Maße unverändert läßt (M II S,

vgl. S. 423 bis 425, Versuch 10 bis 13). Es zeigte sich, daß an solchen Blk. die Morphinwirkung geringer ist als an Phosphat- und Sulfat-Blk.

Versuch 8e zeigt einen weitgehenden Parallelismus der Wirkung der verschiedenen Alkaloidsalze auf unbehandelte und in M II S gewaschene Blk. Nur eine mäßige Verschiebung im Sinne verminderter Empfindlichkeit der gewaschenen Blk. ist erkennbar. Da in beiden Versuchsreihen nicht die gleiche Zahl von Blk. in die Versuche kam, außerdem das Blut verschiedener Tiere benutzt werden mußte (die M II S-Suspension war schon mehrere Tage alt), ist dieser Unterschied nicht exakt auszuwerten. Da aber die Zahl der Blk. in dem „Waschversuch" auf gleiche Alkaloidkonzentration geringer war als in dem Versuch mit frischem, ungewaschenem Blut, spricht alles dafür, daß tatsächlich das Waschen in dieser Lösung eine Steigerung der Resistenz (vielleicht auch eine Verringerung der Permeabilität) herbeigeführt hat.

Zusammenfassung.

1. Es bestätigt sich, daß als *beste Konservierungsflüssigkeit* für rote Blk. eine nach dem Prinzip von *Rous* und *Turner* (1) zusammengesetzte Salz-Zuckermischung anzusehen ist. Die hier hauptsächlich mit gutem Erfolg benutzte Lösung bestand aus $^2/_3$ äquilibrierter, blutisotonischer Salzlösung und $^1/_3$ isotonischer (9,15 proz.) Saccharoselösung. Die Salzlösung enthielt: 0,90 Proz. $NaCl$; 0,098 Proz. KCl; 0,098 Proz. $CaCl_2$; 0,049 Proz. $NaHCO_3$ (vgl. S. 419). Es gelang, in dieser Lösung gewaschene und suspendierte Rinder- und Kälber-Blk. 20 Tage lang bei konstantem Volumen und 40 Tage unhämolysiert zu erhalten. Bei Kaninchen-Blk. gelang es nur 10 Tage. Mit einem Salz-Dextrosegemisch wurden nicht ganz so gute Resultate erzielt.

2. Das *Volumen* der Blk. war in dem Salz-Zuckergemisch gegenüber reinem Kochsalz und Serum nur um wenige Prozent herabgesetzt, in der benutzten isotonischen Phosphatlösung (S. 418) gleich oder etwas vergrößert. In isotonischer Na_2SO_4-Lösung war es erheblich geringer, ebenfalls in Saccharoselösung. Jedoch hielt es sich bei dem Sulfat auf dem einmal angenommenen Werte mehrere Tage konstant, während es sich bei dem Rohrzucker in den meisten Fällen noch mehrere Tage lang fortschreitend verringerte. Die Erscheinungen bei der Dextrose waren im Prinzip analog, nur nicht ganz so regelmäßig. In den verschiedenen Chloridlösungen unterschied sich das Volumen nicht erheblich.

3. *Alkaloidversuche.*

a) Es konnte bestätigt werden, daß Morphin, Methyl- und Äthylmorphin als Chloride kochsalzgewaschene Blk. in der genannten Reihenfolge zunehmend hämolysieren. Ebenso war das Verhältnis bei ungewaschenen und zuckergewaschenen Blk., Äthylmorphin also stets stärker wirkend als Morphin.

b) Es wurde bestätigt, daß Waschen und Aufschwemmen der Blk. in Saccharose die Wirkung der genannten Alkaloide abschwächt.

c) Partieller oder vollständiger Ersatz der Chloridionen in den Alkaloidlösungen durch Sulfat- oder Phosphationen bewirkte Hemmung der Hämolyse. Dagegen hatte *Vorbehandlung* der Blk. mit Phosphat oder Sulfat eine andersartige Wirkung. Waschung und Suspension der Blk. in der Phosphatlösung verstärkte die Codein- und Dioninhämolyse im Vergleich zu kochsalzgewaschenen Blk., während sie die Morphinwirkung eher abschwächte. Sulfatvorbehandlung verstärkte die Dioninhämolyse, doch nicht in so hohem Grade wie Phosphatvorbehandlung, schwächte Morphin- und Codeinhämolyse ab.

d) Vom Chinin wirkte in den geringen Konzentrationen, in denen das Sulfat noch löslich ist ($^1/_{500}$), Chlorid und Sulfat gleich wenig hämolytisch. In 1proz. Konzentration wirkte das Chlorid auf Phosphat-Blk. stärker als auf Chlorid-Blk.

4. *Phosphatbehandlung* verzögerte die Spontanhämolyse in ungefähr gleichem Grade wie Behandlung mit der *Rous*- und *Turner*schen Salz-Zuckermischung und hemmte die Hypotoniehämolyse um ein geringes (gegenüber Kochsalz).

5. *Rohrzucker* wirkte volumenvermindernd und in jeder Hinsicht resistenzvergrößernd (gegen Spontan-, Hypotonie- und Alkaloidhämolyse). Entsprechend der fortschreitenden Volumenverminderung der Rohrzucker-Blk. wächst die Resistenz gegen hämolytische Einwirkungen im Laufe mehrerer Tage. Als drittes Zeichen einer zunehmenden Verhärtung zeigt sich eine von Tag zu Tag stärker hervortretende Unfähigkeit, im Hämotokriten lackfarben zu werden, also wohl ein Verlust an Plastizität (Gelatinierung oder Koagulation).

Literatur.

1) *Rous* und *Turner*, Journ. of exper. Med. **23**, Nr. 2, S. 219 und 239 1916. — 2) *Sogen*, Tohoku Journ. of exper. Med. **1**, 367. — 3) *Pepper*, Arch. of intern. Med. **30**, 801, 1922; zitiert nach Ronas Ber. **18**, 493. — 4) *Rhode*, diese Zeitschr. **131**, 560, 1922. — 5) *Hiruma*, Pflügers Arch. **200**, 497, 1923. — 6) *Luger*, diese Zeitschr. **117**, 145. — 7) *Brahmachari* und *Sen*, Biochem. Journ. **15**, 463; zitiert nach Ronas Ber. **10**, 250. — 8) *Rusznyak*, diese Zeitschr. **104**, 9. — 9) *Snapper*, ebendaselbst **43**, 266, 1912. — 10) *Brinkman*, Arch. néerland. de physiol. de l'homme et des anim. **6**, 451. — 11) *Brinkman* und *van Dam*, diese Zeitschr. **108**, 35 und 52. — 12) *Hamburger*, ebendaselbst **129**, 163. — 13) *Handovsky*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **69**, 412, 1912. — 14) *Derselbe*, Pflügers Arch. **195**, 253, 1922. — 15) *Handovsky* und *Masaki*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **100**, 257. — 16) *Höber*, diese Zeitschr. **14**, 209, 1908. — 17) *Höber* und *Nast*, ebendaselbst **60**, 131, 1914. — 18) *Port*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **99**, 259, 1910. — 19) *Miculicich*, Zentralbl. f. Physiol. **24**, 523, 1910. — 20) *Ashby*, Amer. Journ. of Physiol. **68**, 239, 250, 585 und 611; zitiert nach Ronas Ber. **27**,

353 und **29**, 251. — 21) *Kl. Gollwitzer-Meier*, diese Zeitschr. **139**, 86. — 22) *Jarisch*, Pflügers Arch. **192**, 255, 1921. — 23) *Simmel* und *Einstein*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 1646. — 24) *Beckmann*, diese Zeitschr. **135**, 317. — 25) *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., 1924, Kap. VII und IX. — 26) *Rona* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **49**, 370. — 27) *Jacques Loeb*, Amer. Journ. of Physiol. **6**, 411, 1902; zitiert nach (25). — 28) *Derselbe*, Pflügers Arch. 88, 68. — 29) *Sörensen*, diese Zeitschr. **21**, 131. — 30) *Dietrich* und *Kaminer*, Handb. d. Balneologie **2**, 193, 1922. — 31) *Ege*, diese Zeitschr. **115**, 109. — 32) *Tanaka*, Pflügers Arch. **203**, 447, 1924. — 33) *Gürber*, Habilitationsschrift, Würzburg 1904. — 34) *Masing*, Pflügers Arch. **149**, 227. — 35) *Rhode*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **91**, 173. — 36) *Friede*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **40**, 69, 78. — 37) *Bang*, diese Zeitschr. **16**, 255. — 38) *Gürber*, Sitzungsber. d. physik. med. Ges. Würzburg 1895. — 39) *Koeppe*, Pflügers Arch. **67**, 189. — 40) *Hamburger*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **69**, 663, 1909. — 41) *Wiechmann*, Pflügers Arch. **189**, 109, 1921. — 42) *Siebeck*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **85**, 214, 1919. — 43) *Kl. Gollwitzer-Meier*, diese Zeitschr. **140**, 608. — 44) *Haffner*, Pflügers Arch. **179**, 144, 1920. — 45) *Bethe*, diese Zeitschr. **127**, 18, 1922. — 46) *Derselbe*, Hofmeisters Beitr. **6**, 399, 1905; zitiert nach (25). — 47) *Gabbe*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **39**, 276. — 48) *Höber* und *Memmesheimer*, Pflügers Arch. **198**, 564, 1923. — 49) *Pauli* und *Rona*, Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 1902. — 50) *Samec*, Kolloidchem. Beihefte **3**, 1912. — 51) *Takei*, diese Zeitschr. **123**, 104.

Über das Vorkommen einer schwefelhaltigen Aminosäure im alkoholischen Extrakt der Hefe.

Von

Sator Odake.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 25. Juni 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Vor kurzem haben *U. Suzuki*, *T. Mori* und der Verfasser eine neue schwefelhaltige Substanz von der Formel $C_{11}H_{15}N_5SO_3$ (Adenyl-thio-methylpentose) aus dem alkoholischen Extrakt der Hefe isoliert[1]. Der Verfasser hat die Studien des alkoholischen Extrakts der Hefe weiter fortgesetzt und in der Mutterlauge der oben erwähnten Substanz noch eine weitere schwefelhaltige Aminosäure in folgender Weise aufgefunden.

Der alkoholische Extrakt der Hefe wurde in vacuo bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Syrup in wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Tanninlösung versetzt. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde in gewöhnlicher Weise mit Baryt zerlegt und filtriert. Das Filtrat wurde nach Entfernung des überschüssigen Baryts stark eingeengt, wobei sich Kristalle von Adenyl-thio-methylpentose ausschieden, die abfiltriert wurden. Das Filtrat wurde jetzt mit so viel starkem Alkohol versetzt, bis die Konzentration desselben 80 Proz. betrug, wobei ein voluminöser weißer Niederschlag ausfiel, welcher abgesaugt und mehrmals aus verdünntem Alkohol umkristallisiert wurde. Diese Kristalle erwiesen sich als ein Gemisch von Leucin und einer schwefelhaltigen Substanz. Da die Trennung beider Substanzen durch fraktionierte Kristallisation fast unmöglich war, so wurden sie wieder in Wasser gelöst und mit einer gesättigten Lösung von Quecksilberchlorid versetzt. Die hierdurch als unlösliches Doppelsalz gefällte

---

[1]) *U. Suzuki*, *S. Odake* und *T. Mori*, diese Zeitschr. **154**, 278, 1925.

schwefelhaltige Substanz wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt Diese Operation wurde noch einmal wiederholt. Die erhaltenen Kristalle wurden aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. So erhielt man 0,6 g reines Produkt aus etwa 6000 kg frischer Hefe. Der Verfasser hat nun diese Substanz nach der *Pregl*schen mikroanalytischen Methode analysiert und ihre empirische Formel als $C_5H_{11}SNO_2$ festgestellt; höchstwahrscheinlich handelt es sich um eine schwefelhaltige Aminosäure. Die Substanz bildet farblose, dünne monoklinische Tafeln. Im Kapillarrohr schmilzt sie unter Zersetzung bei 272 bis 273° (unkorrigiert) Sie ist in Wasser und in warmem verdünnten Alkohol leicht, aber in Äther und Petroläther nicht löslich. Das Drehungsvermögen der wässerigen Lösung ist: $[\alpha]_D^{16^0} = -11{,}77^0$. Sie gibt violette Färbung mit Triketohydrindenlösung; die Millon-, Diazo-, Biuret- sowie Eisenchloridreaktionen sind negativ. Mit Quecksilberchlorid und Quecksilbersulfat bildet sie weiße Niederschläge. Sie wird durch Phosphorwolframsäure oder Pikrinsäure nicht gefällt. Selbst kochendes starkes Alkali macht den Schwefel nicht frei, so daß hierbei die Nitroprussid- und Bleiacetatreaktionen versagen. Beide Reaktionen werden erst hervorgerufen, nachdem die Substanz mit metallischem Natrium geglüht ist. Im Gegensatz zu Äthyl-cystein ist sie gegen kochendes starkes Alkali sehr widerstandsfähig und gibt weder Ammoniak, noch Äthyl-mercaptan[1]).

Das Kupfersalz $Cu(C_5H_{10}SNO_2)_2$ bildet hellblaue dünne monoklinische Platten, welche in heißem Wasser etwas löslich, in kaltem Wasser aber fast unlöslich sind.

Das Derivat des α-Naphthylisocyanats $C_{10}H_7NHCO-NH(C_3H_7S)$ $COOH$ kristallisiert in langen weißen Nadeln und schmilzt bei 187° (unkorrigiert). Es ist in Wasser und Äther fast unlöslich, löst sich aber leicht in Alkohol.

Vor einiger Zeit hat *J. H. Müller* eine neue schwefelhaltige Aminosäure von der Formel $C_5H_{11}SNO_2$ aus den durch Schwefelsäure- oder mit kaustischer Alkalihydrolyse gewonnenen Produkten von Casein und Eieralbumin isoliert[2]).

Die schwefelhaltige Substanz des Verfassers zeigt ganz dieselben Eigenschaften, d. h. bis auf den geringen Unterschied im optischen Verhalten mit der *Müller*schen Substanz. Obgleich die Konstitution derselben noch nicht völlig aufgeklärt ist, so ist es klar, daß diese Substanz durch Autolyse des Hefeeiweißes gebildet worden ist.

---

[1]) Vgl. *Brenzinger*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 563, 1892; *C. Neuberg* und *P. Mayer*, ebendaselbst **44**, 489, 1905.

[2]) *J. H Müller*, Journ. of Bact. **7**, 309—325, 1922; Journ. of biol. Chem. **56**, 1, 1923.

Experimenteller Teil.

1. Isolierung der Thioaminosäure.

Frische Bierhefe wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, gepreßt und zweimal mit so viel starkem Alkohol versetzt, bis die Konzentration der ganzen Flüssigkeit 80 Proz. erreichte (Preßhefe enthält etwa 80 Proz. Wasser), und warm extrahiert. Der Extrakt wurde in vacuo eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und zwecks Entfernung ätherlöslicher Stoffe mit Äther extrahiert und der Ätherextrakt zwecks Äthervertreibung eingedampft. Nach dem Erkalten schieden sich Kristalle von Kaliumphosphat aus, die abgesaugt wurden. Das Filtrat wurde mit Tanninlösung versetzt. Der voluminöse Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und mit Baryt verrieben. Die vom Bariumtannat abfiltrierte Flüssigkeit wurde nach der Entfernung des überschüssigen Baryts durch Schwefelsäure stark eingeengt. Nach dem Erkalten schieden sich Adenyl-thio-methylpentose und Kaliumsulfat kristallinisch aus. Die Mutterlauge dieser Kristalle wurde mit so viel Alkohol versetzt, bis die Konzentration derselben 80 Proz. erreichte. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit 80proz. Alkohol ausgewaschen. Das Oryzanin geht bei dieser Behandlung in das Filtrat über. Der Niederschlag wurde wieder in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und mit starkem Alkohol versetzt, bis dieselbe 70proz. wurde, wobei voluminöse kleine kugelige Gebilde ausgeschieden wurden, welche bei wiederholter Umkristallisierung aus 60- bis 70proz. Alkohol als weiße Platten auskristallisierten. Aus ihrer Mutterlauge erhielt man noch eine geringe Menge derselben Kristalle. Die Gesamtausbeute betrug 15 g aus etwa 6000 kg frischer Hefe.

Diese Kristalle enthielten etwas Schwefel, bestanden aber zum größten Teile aus Leucin.

Die Kristalle schmecken bitter und sind dem Leucin sehr ähnlich. Schmelzpunkt gegen 285 bis 287°. Dieselben wurden noch mehrmals aus Alkohol umkristallisiert und jedesmal analysiert:

a) Stickstoffbestimmung.

Analyse	Substanz g	N ccm	Atm. Druck mm	Temperatur °C	N Proz.
I	0,0700	6,6	762	17	10,97
II	0,0700	6,5	764	16	10,90

b) Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung.

Analyse	Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
I	0,1538	0,3012	0,1360	53,41	9,82
II	0,1521	0,2977	0,1301	53,39	9,50

c) Schwefelbestimmung nach *Carius*.

Analyse	Substanz g	$BaSO_4$ g	S g	S Proz.
I	0,1500	0,0262	0,003 598	2,40
Ia	0,1500	0,0253	0,003 433	2,29
IIa	0,1500	0,0250	0,003 433	2,20
II	0,1500	0,0266	0,003 571	2,38

Die Formoltitration nach *Sörensen* gab folgendes Resultat.

Substanz g	KOH sol ccm	KOH g
0,1000	5,6	0,029 37

Diese Substanz wurde mit 30facher Menge 20proz. Schwefelsäure 10 Stunden gekocht, dann wurde mittels Baryt die Schwefelsäure genau entfernt und die Flüssigkeit eingedampft. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden aus heißem Alkohol umgelöst. Die Substanz hatte sich bei der obigen Operation nicht verändert. Mit 15proz. Salzsäure 10 Stunden gekocht, wies sie weder eine Zersetzung noch eine Veränderung auf. Daher nahm der Verfasser an, daß diese Substanz ein schwer trennbares Gemisch von Leucin mit einer schwefelhaltigen Substanz darstellt.

Auch die Trennung über das Kupfersalz erwies sich als erfolglos. Erwärmt man die wässerige Lösung der Substanz mit Kupferacetatlösung, so erhält man ein fast unlösliches Kupfersalz, welches mit Leucinkupfer große Ähnlichkeit hat. Es wurde aus heißem Wasser fraktioniert, kristallisiert und analysiert.

Analyse	Substanz g	Cu_2S g	Cu g	Cu g
I	0,1500	0,0457	0,030 52	20,37
II	0,1500	0,0458	0,030 63	20,42
Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ . . .				19,63

Hieraus geht hervor, daß man auf diesem Wege eine Trennung schwer bewerkstelligen kann. Nach verschiedenen Versuchen ist es dem Verfasser gelungen, durch Verwendung von Quecksilbersalz das Ziel zu erreichen. Wird eine wässerige Lösung von Mercurichlorid oder -sulfat einer wässerigen Lösung oben genannten Gemisches zugegeben, so entsteht ein schwerer weißer Niederschlag, der sich beim Erwärmen teilweise auflöst und beim Erkalten wieder ausscheidet. Der Schwefel war fast ausschließlich in diesem Niederschlag enthalten, während das Filtrat fast schwefelfrei war. So wurden 12 g dieser Mischkristalle in 300 ccm warmen Wassers gelöst und mit einer gesättigten

Sublimatlösung in kleinem Überschuß versetzt und in kaltem Zimmer über Nacht stehengelassen. Man saugt nun den weißen Quecksilberniederschlag ab und wäscht ihn mit wenig Wasser aus; dann wird er in wenig Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Die vom Mercurisulfid filtrierte Flüssigkeit wurde in vacuo zur Trockne eingedampft, um den größten Teil der Salzsäure auszutreiben. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und mit einem kleinen Überschuß von Silberoxyd zwecks Entfernung noch vorhandener Salzsäure verrieben. Das Filtrat wurde nach dem Entfernen des Silbers mit Schwefelwasserstoff in vacuo eingedampft. Nach dem Erkalten schied sich die schwefelhaltige Substanz kristallinisch aus, welche nochmals in Wasser gelöst und mit Quecksilberchlorid wie oben behandelt wurde.

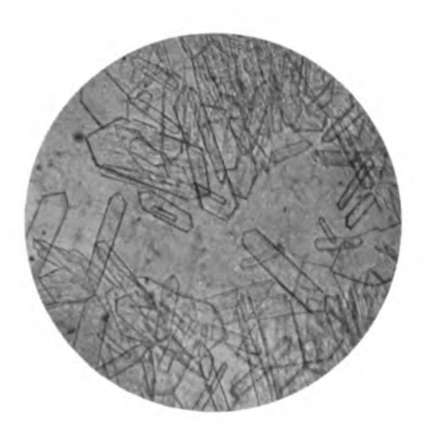


Abb. 1A.
Freie S-haltige Aminosänre $C_5H_{11}SNO_2$ (1 : 330).

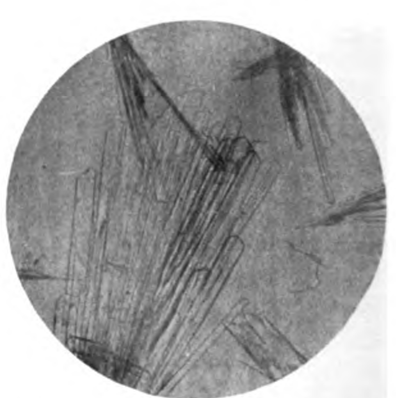


Abb. 1B.
Freie S-haltige Aminosäure $C_5H_{11}SNO_2$ aus verdünnter Lösung (1 : 330).

Die erhaltenen Kristalle wurden in warmem Wasser gelöst und mit 3- bis 4facher Menge Alkohol versetzt; nach dem Erkalten schieden sich schöne dünne Tafeln aus, welche ganz verschieden von Leucinkristallen waren. Diese Kristalle wurden abgesaugt, mit 80proz. Alkohol, dann mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Aus dem Filtrat wurde noch eine kleine Menge Kristalle erhalten. Noch einmal aus 60- bis 70proz. Alkohol umgelöst, wurden sie vollständig rein. Sie bilden farblose, äußerst dünne perlmutterglänzende, monoklinische Tafeln (Abb. 1A). Aus ganz verdünnter Lösung langsam auskristallisiert, bilden sie lange, manchmal büschelförmige Kristalle (Abb. 1B). Im Kapillarrohr erhitzt, verfärbt sich diese Substanz gegen 250° und zersetzt sich unter Schwärzung bei 272 bis 273° (unkorrigiert). Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug nur 0,6 g.

2. *Analyse der schwefelhaltigen Aminosäure.*

Das in vacuo bei 100° getrocknete Präparat wurde nach der *Pregl*-schen Mikromethode analysiert.

a) Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff.

Nr.	Substanz mg	CO_2 mg	H_2O mg	C Proz.	H Proz.
3	6,695	10,032	4,575	40,87	7,65
4	7,951	11,964	5,432	41,04	7,65

b) Stickstoffbestimmung.

Nr.	Substanz mg	Stickstoff ccm	Vol.-Proz.	Atm. Druck mm	Temperatur °C	N Proz.
1	4,088	0,3254	0,332—2	760	17	9,37
2	6,050	0,4929	0,503—2	759	17	9,58

c) Schwefelbestimmung.

Nr.	Substanz mg	$BaSO_4$ mg	S mg	S Proz.
5	8,400	13,287	1,8246	21,60
6	8,012	12,765	1,7529	21,86

Zusammenfassung der Analysendaten.

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.
Gefunden I	40,87	7,65	9,37	21,60
„ II	41,04	7,65	9,58	21,88
Berechnet für $C_5H_{11}SNO_2$ . . .	40,24	7,43	9,39	21,50

Die Analyse stimmt mit der Formel $C_5H_{11}SNO_2$ gut überein. Überdies wurde der Aminostickstoff nach *van Slyke*scher Mikromethode und *Sörensens* Formoltitrierungsmethode bestimmt.

a) Aminostickstoffbestimmung nach *van Slyke*scher Mikromethode.

Substanz mg	N ccm	N mg	Atm. Druck mm	Temperatur °C	Stickstoff Proz.
9,84	1,630	0,925 03	758	20	9,40

b) Aminostickstoffbestimmung nach *Sörensens* Formoltitrierungsmethode.

Substanz mg	Verbraucht n/100 KOH ccm	KOH mg	NH_2-N mg	N Proz.	Carboxyl-H mg	H Proz.
10,75	6,8	3,808	0,952	8,86	0,068	0,63
10,56	6,7	3,752	0,920	8,71	0,067	0,63

c) Zusammenfassung obiger Daten

Gefunden	Aminostickstoff Proz.	Carboxylwasserstoff Proz.
I (*van Slyke*)	9,40	—
II (*Sörensen*)	8,86	0,63
III (*Sörensen*)	8,71	0,63
Berechnet für $C_3H_7S.CH.NH_2$ / $\vert$ / COOH	9,39	0,68

Hieraus kann man schließen, daß der Gesamtstickstoff als Aminostickstoff, ferner, daß eine Carboxylgruppe in der Substanz enthalten ist.

3. Eigenschaften der Thioaminosäure.

Die schwefelhaltige Aminosäure löst sich in kaltem, leichter in warmem Wasser, auch in warmem, verdünntem Alkohol und scheidet sich beim Erkalten wieder aus. In absolutem Alkohol, Äther, Benzol und Aceton ist sie unlöslich. Aus Wasser oder verdünntem Alkohol kristallisiert die Säure in sehr dünnen, farblosen, weichen, glänzenden monoklinischen Tafeln (Abb. 1A). Aus verdünnter Lösung scheiden sie sich langsam als lange verwachsene Prismen aus.

Im Kapillarrohr erhitzt, wird sie gegen 250° hellbraun, schrumpft gegen 265 bis 270° zusammen und zersetzt sich unter Bräunung bei 272 bis 273° (offenes Kapillarrohr) oder bei 271 bis 272° (in geschlossenem Kapillarrohr) und hinterläßt dabei eine schwarzbraune Flüssigkeit.

Optisches Verhalten: 41,00 mg werden in 2,0107 ccm (= 2,00866 g bei 16°) Wasser gelöst und in 10-cm-Rohr das Drehungsvermögen bestimmt.

$$\alpha = -0{,}24^0\ (16^0),$$
$$[\alpha]_D^{16^0} = -11{,}77^0.$$

4. Reaktionen der Thioaminosäure.

1. Die wässerige Lösung gibt, mit 1proz. Lösung von Triketohydrinden erwärmt, eine schöne violette Färbung.

2. Mit Kupferhydroxyd, Kupferacetat und Kupfercarbonat erwärmt, gibt sie blauviolette Färbung; beim Erkalten scheiden sich fast unlösliche Kupfersalze aus.

3. Mit Mercurichlorid, Mercurisulfat und Mercurinitrat gibt sie in kaltem Wasser schwerlösliche weiße Fällung. Das Mercurichloriddoppelsalz ist namentlich zur Trennung dieser Substanz von anderen Aminosäuren, ganz besonders von Leucin, geeignet.

4. *Schwefelreaktionen:*

   a) Mit konzentriertem Alkali stark erhitzt und mit Bleiacetat oder Natriumnitroprussid versetzt, gibt die Substanz keine schwarze Fällung, noch violette Färbung.

b) Mit einem Stückchen metallischen Natriums geglüht und in Wasser gelöst, gibt sie starke Bleiacetat- oder Nitroprussidreaktion. Der Schwefel ist deshalb nicht leicht abspaltbar, wie beim Äthylcystein.

c) Die wässerige Lösung gibt keine weiße Fällung mit Bariumchlorid. Wenn man aber diese Substanz mit Glühgemisch glüht, in verdünnter Salzsäure löst und mit Bariumchlorid versetzt, so wird die weiße Bariumsulfatfällung hervorgerufen.

5. Mit Schwefelsäure angesäuert, liefert sie mit Phosphorwolframsäure keine Fällung. Sie gibt auch keine Fällung mit Pikrinsäure.

6. *Bials* Probe auf Furfurol negativ; mit Phloroglucin und Salzsäure gibt sie keine Färbung.

7. *Kossels* Probe auf Adenin negativ; mit 3proz. Salzsäure unter Zusatz von Zink erhitzt, liefert sie keine rote Färbung.

8. Sie gibt auch keine Eisenchlorid-, Ferrocyankalium-, Diazo-, Biuret-, *Millon*sche noch *Folin*sche Reaktion.

5. *Kupfersalz der Thioaminosäure.*

Die schwefelhaltige Aminosäure bildet, mit Kupferhydroxyd oder Kupferacetat erwärmt, ein schwerlösliches, hellblauviolettes Kupfersalz, welches in Alkohol, Petroläther, Äther, Aceton unlöslich ist. Es löst sich in 6000 Teilen heißen Wassers und kristallisiert daraus beim Erkalten in blauvioletten, dünnen monoklinischen Tafeln aus (Abb. 2). Es zeigt keinen konstanten Schmelz- noch Zersetzungspunkt. Im Kapillarrohr erhitzt, wird es gegen 230 bis 240° grau, später schwarzbraun, schmilzt aber bei 350° nicht. Das gereinigte, bei 110° getrocknete Kupfersalz wurde nach *Pregl* analysiert. Zur Bestimmung des Kupfers wurde es als Kupfersulfür gefällt und durch Erhitzen mit Schwefelsäure in Kupfersulfat übergeführt, oder es wurde der bei der Kohlenstoff- und Schwefelbestimmung im Platinschiffchen zurückgebliebene Rückstand in einem Tröpfchen verdünnter Schwefelsäure gelöst und in einem Glasrohr im *Pregl*schen Mikromuffel geglüht und als Kupfersulfat gewogen.



Abb. 2. Kupfersalz der S-haltigen Aminosäure $Cu(C_5H_{10}SNO_2)_2$ (1 : 250).

a) Stickstoffbestimmung.

Nr.	Substanz mg	Stickstoff ccm	N-Volum-korrektion Vol.-Proz.	Atm. Druck mm	Temperatur °C	Stickstoff Proz.
1	8,32	0,518	(0,528—2)	771	14	7,51
2	4,64	0,294	(0,300—2)	760	15	7,51
3	5,595	0,357	(0,364—2)	759	14	7,55

b) Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Kupferbestimmung.

Nr.	Substanz mg	CO_2 mg	H_2O mg	$CuSO_4$ mg	C Proz.	H Proz.	Cu Proz.
4	8,063	9,667	4,261	3,592	32,70	5,81	17,74
5	6,376	7,841	3,436	2,840	33,54	6,03	17,79

c) Schwefel- und Kupferbestimmung.

Nr.	Substanz mg	$BaSO_4$ mg	$CuSO_4$ mg	Schwefel Proz.	Kupfer Proz.
6	6,15	7,79	—	17,39	—
7	8,52	10,95	3,80	17,76	17,64

d) Kupferbestimmung.

Nr.	Substanz mg	$CuSO_4$ mg	Cu mg	Cu Proz.
8	7,45	3,30	1,314 23	17,64
9	7,74	3,47	1,381 93	17,85

Zusammenfassung obiger Resultate.

Nr.	Gefunden	C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.	Cu Proz.
1		32,70	5,87	7,51	17,39	17,74
2		33,54	6,03	7,51	17,65	17,79
3		—	—	7,55	—	17,76
4		—	—	—	—	17,64
5		—	—	—	—	17,85
	Berechnet für $(C_5H_{10}SNO_2)_2Cu$	33,38	5,56	7,79	17,78	17,64

Es geht hieraus hervor, daß die Analyse gut mit der Formel $Cu(C_5H_{10}SNO_2)_2$ übereinstimmt.

6. α-Naphthylisocyanat-derivat.

0,05 g Substanz wurden in 3,4 ccm n/10 Natronlauge gelöst, unter Kühlung mit 0,06 g α-Naphthylisocyanat[1]) tropfenweise versetzt und kräftig geschüttelt. Nach einstündigem Stehen wurde abfiltriert und das klare Filtrat mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Es entstand ein weißer voluminöser Niederschlag, welcher nach einiger Zeit abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und aus verdünntem Alkohol umkristallisiert wurde. Es entstanden lange weiße Prismen (Abb. 3). Schmelzpunkt 187° (unkorrigiert). Es ist schwer löslich in Wasser, leichter in Alkohol, aber unlöslich in Äther und Benzol, und es enthält kein Kristallwasser.



Abb. 3.
α-Naphthyl-iso-cyanat-derivat
$C_{16}H_{18}H_{16}SN_2O_3$ (1 : 250).

Analyse der in vacuo bei 80° getrockneten Substanz nach *Pregl.*

Nr.	Substanz mg	N ccm	Atm. Druck mm	Temperatur °C	$BaSO_4$ mg	N Proz.	S Proz.
1	7,02	0,529	760	19,05	—	8,79	—
2	6,83	0,514	760	19,05	—	8,78	—
3	9,78	—	—	—	7,47	—	10,39
4	9,28	—	—	—	6,86	—	10,15
Berechnet für $C_{16}H_{18}N_2SO_3$						8,81	10,08

Zusammenfassung.

Aus dem alkoholischen Extrakt der Hefe wurde eine schwefelhaltige Aminosäure von der Formel $C_5H_{11}SNO_2$ (Schmelzpunkt 272 bis 273°) isoliert, und es wurde festgestellt, daß sie mit der von *J. H. Müller* unter den Abbauprodukten des Caseins und Eieralbumins aufgefundenen Substanz identisch ist. Wahrscheinlich ist sie aus Hefeeiweiß durch Autolyse entstanden.

Herrn Prof. *U. Suzuki* spreche ich meinen aufrichtigen Dank für seine wertvollen Ratschläge aus. Herrn Dr. *T. Higashi* bin ich verpflichtet für seine wertvolle Hilfe bei der Mikroanalyse und der Firma Sankyo & Co. für die freundliche Überlassung des Ausgangsmaterials.

[1]) Vgl. *C. Neuberg* u. *A. Manasse*, Ber. **38**, 2359, 1905.

Über die Maltase des Gerstenmalzes.

Von

Hans Pringsheim und **Jesaia Leibowitz.**

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 26. Juni 1925.)

Gelegentlich der Versuche, Stärke durch Malzamylase quantitativ zu verzuckern, ist die wechselvolle Wirkung der Gerstenfermente auf das Polysaccharid in Fällen der Erreichung einer 100proz. Maltosebildung des öfteren, so in neuerer Zeit z. B. von *Lintner*[1]) und von *Willstätter*[2]), auf die gelegentliche Anwesenheit von Maltase zurückgeführt worden. Auch *Maquenne* hat in der letzten Veröffentlichung[3]) vor seinem Tode darauf hingewiesen und die Klärung der angeschnittenen Frage der Nachwelt überlassen. Im Laufe unserer letztjährigen Arbeiten konnten wir zeigen, daß eine fast 100proz. Maltosebildung aus Stärke durch die Malzfermente auch ohne die Beteiligung einer Malzmaltase in Ausnahmefällen vorkommt[4]). Bei diesen Studien, wie besonders auch bei den Untersuchungen des Komplements der Amylasen[5]), haben wir sehr zahlreiche Malzextrakte bereitet und sie ausnahmslos frei von maltatischer Wirkung gefunden[6]). Von anderer Seite wurde im Malz neben dem diastatischen Enzym eine kleine Menge Maltase beobachtet[7]); und ihre nur geringe Wirkung[8]) auf die Vernichtung durch die stark saure Reaktion im Extrakt der keimenden Samen zurückgeführt[9]).

---

[1]) *Lintner* und *Kirschner*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, 119, 1923.

[2]) *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Hesse*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **126**, 143, und zwar 144, 1923.

[3]) *Maquenne*, C. r. **176**, 804, 1923.

[4]) *H. Pringsheim* und *Schmalz*, diese Zeitschr. **142**, 108, 1923.

[5]) *H. Pringsheim* und *Fuchs*, Ber. **56**, 1762, 1923; *H. Pringsheim* und *Beiser*, diese Zeitschr. **148**, 336, 1924.

[6]) *H. Pringsheim* und *Leibowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **131**, 262, 1923; Ber. **58**, 1262, 1925.

[7]) *H. v. Euler*, Die Chemie der Enzyme **2**, T. 1, S. 152, 1922.

[8]) *Ling* und *Nanji*, Biochem. Journ. **17**, 593, 1923.

[9]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., **1**, 576. Leipzig 1925.

Unerwarteterweise sind wir in einer Lieferung von Trockenmalz der Byk-Guldenberg-A.-G. auf ein sehr energisch wirkendes, maltosespaltendes Ferment gestoßen, welches von den bisher bekanntgegebenen pflanzlichen und tierischen Maltasen verschieden sein dürfte, da es nicht die diesen eigentümliche Empfindlichkeit gegen eine saure Reaktion des Mediums zeigt und sein Aktivitätsoptimum stark in saurer Richtung verschoben ist. Unsere Gerstenmaltase zeigt einen so breiten Wirkungsbereich, daß sie auch bei der Säurebildung während des Keimprozesses nicht vernichtet werden könnte; sie ist noch wirksam zwischen den Wasserstoffzahlen 3 und 7,5 und entfaltet ihre stärkste Wirksamkeit bei p_H = 4,5 bis 5, also in scharfer Anpassung an die Malzamylase[1]) und verschiedene andere Fermente des Malzes, wie die Cellobiase[2]), die Lichenase[3]) und die Mannanase[4]), mit deren weiterer Bearbeitung wir beschäftigt sind. Dagegen liegt das optimale p_H der Hefenmaltase bei 6,8[5]).

So geht jedenfalls aus unseren Beobachtungen hervor, daß das Phänomen der Verzuckerung der Stärke durch die Malzfermente ein recht komplexer Vorgang ist, und daß man auf die mögliche Mitwirkung der Malzmaltase immer gewappnet sein muß. Hierzu führen wir den folgenden Stärkespaltungsversuch an, dessen Verfolgung uns zur Auffindung der Maltase geführt hat:

25 ccm 0,94proz. Stärkelösung, 10 ccm Citratpuffer p_H = 4,8, 10 ccm Wasser, 5 ccm Malzauszug, bei 38°. Titrationen mit je 5 ccm

Zeit Std.	Cu mg	Spaltung berechnet auf Maltose Proz.
0	1,9	—
8	23,8	95
24	34,5	130
48	38,0	150

Aus dem Rest der Lösung konnten reichliche Mengen Glucosazon (Fp. 204°) gewonnen werden.

Die Prüfung des Verhaltens gegenüber Maltose bei den Aciditätsoptima der Hefemaltase (I) bzw. der Malzamylase (II) ergab folgende Resultate:

---

1) *Sherman, Thomas* und *Baldwin*, Journ. Amer. Chem. Soc. **41**, 231, 1919; *Euler* und *Svanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 193, 1921.

2) *H. Pringsheim* und *Kusenack*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **140**, 304, 1924.

3) *H. Pringsheim* und *Seifert*, ebendaselbst **128**, 284, 1923.

4) Nach Versuchen des Herrn *A. Genin*.

5) *Willstätter, Kuhn* und *Sobotka*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 224, 1924.

10 ccm 2,5proz. Maltoselösung, 10 ccm Puffer (I: Phosphat $p_H = 6,8$, II: Citrat $p_H = 4,8$), 25 ccm Wasser, 5 ccm Malzauszug, bei 35°. Titration mit je 5 ccm.

	Zeit Std.	Cu mg	Spaltung Proz.
I:	0	26,1	—
	8	29,2	10
	24	34,7	35
II:	0	26,1	—
	18	34,9	35
	48	43,5	70

Schließlich hat Herr *A. Genin* in einem Serienversuch die Aktivitätskurve des Ferments ermittelt:

5 ccm 2,5proz. Maltoselösung, 10 ccm Puffer (Citrat $p_H = 3$ bis 5, Phosphat $p_H = 5,5$ bis 7,5), 5 ccm Wasser, 5 ccm Malzauszug, bei 37°. Titration mit je 5 ccm.

p_H =	3,0		3,5		4,0		4,5		5,0	
Zeit Std.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.
0	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—
5	26,9	Spuren	27,7	6	30,5	20	30,6	20	30,6	20
24	27,0	„	28,1	8	37,8	50	40,1	55	42,0	60

p_H =	5,5		6,0		6,5		7,0		7,5	
Zeit Std.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.	Cu mg	Spaltung Proz.
0	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—
5	28,7	10	28,3	10	28,0	10	28,0	10	—	—
24	42,0	60	39,1	55	36,6	45	36,5	45	26,8	Spuren

Die Säurebindung des Blutes bei gesunden und kranken Kindern.

Von

Josef Csapó und Géza Mihalovics.

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderspital in Verbindung stehenden Universitäts-Kinderklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 26. Juni 1925.)

Während verschiedene Autoren zur Feststellung der Säurebindung des Blutserums mehrere Methoden ausgearbeitet haben und sich damit viel befaßten, finden wir in der Literatur bezüglich der Säurebindung des Blutes nur wenig Angaben. Bei der Feststellung der Säurebindung des Blutes bildete das Hämoglobin das größte Hindernis. Da das Hämoglobin selbst farbig ist, konnte die Säurebindung des Blutes mittels unmittelbarer Titrierung nicht festgestellt werden, denn das Hämoglobin verdeckte die Farbe des Indikators, und so war die Farbenveränderung desselben noch weniger konstatierbar. Zur Bestimmung der Säurebindung des Blutes ist daher nur ein solches Verfahren geeignet, bei welchem das Hämoglobin von der zu titrierenden Flüssigkeit irgendwie abgesondert werden kann. Diesem Erfordernis entspricht vollkommen das von *Bosányi* und *Csapó*[1]) unlängst beschriebene Verfahren, bei dem die Eiweißkörper samt der gebundenen Säure ausgefällt werden und nach Filtrierung des Niederschlages die Titrierung in einem hämoglobinfreien, farblosen Medium ausgeführt wird. Nachdem in dieser Richtung mit der oben angegebenen Methode noch keine Untersuchungen angestellt wurden, schien es uns nicht überflüssig, die Säurebindung des Blutes an dem zur Verfügung stehenden Krankenmaterial festzustellen. Die zu beantwortenden Fragen waren folgende: 1. Wie groß ist die Gesamtsäurebindung des Blutes? 2. Was für ein Verhältnis besteht zwischen der Säurebindung des Blutes und des Plasmas? 3. Wieviel entfällt von der durch das Blut gebundenen Säure auf das Plasma und wieviel auf die roten Blutkörperchen? 4. Kann bezüglich der erwähnten Eigenheiten irgend ein Unterschied bei gesunden und kranken Kindern gefunden werden?

Methodik.

Zur Bestimmung der Säurebindung des Blutes wogen wir in ein mit dem Zeichen 4 ccm versehenes Zentrifugierröhrchen 0,04 g feingepulvertes Natriumfluorid, ließen aus einer Armvene bis zum Zeichen

---

[1]) *Bosányi* und *Csapó*, diese Zeitschr. **153**, 185, 1924.

Blut hineinfließen und schüttelten es, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Von diesem Blute versetzten wir 1 ccm in ein Becherglas und wuschen die Pipette dreimal mit destilliertem Wasser durch. Die Waschflüssigkeit wurde mit dem im Becherglase befindlichen Blute vereinigt. Dann gaben wir 30 ccm n/50 HCl und 10 ccm K_2HgJ_4-Lösung (Zusammensetzung 5,7 g HgJ_2 + 12,5 g KJ + 250 ccm H_2O) dazu, welch letztere sowohl die Plasmaeiweißkörper, wie auch das Hämoglobin in Form ihrer salzsauren Salze ausfällt. Den Niederschlag filtrierten wir mittels Filtrierpapiers von *Schleicher* und *Schüll*, wuschen denselben mit 80 bis 100 ccm destillierten Wassers und titrierten die im Filtrat befindliche überflüssige Säure mit n/50 NaOH zurück, wobei wir als Indikator alizarinsulfosaures Natrium verwendeten. Die Differenz zwischen der dem Blute hinzugefügten und der zurücktitrierten Säure gibt die Menge der durch das Blut gebundenen Säure. Nachdem das NaF dem alizarinsulfosauren Natrium gegenüber eine gewisse saure Reaktion zeigt, haben wir vorher festgestellt, wieviel n/50 Lauge zur Titrierung von 0,01 g NaF nötig sei, um mit dem erwähnten Indikator eine Übergangsfarbe zu zeigen. Hierzu waren 0,2 ccm n/50 Lauge erforderlich. 1 ccm Blut enthielt 0,01 g NaF, dessen Säuregrad 0,2 ccm n/50 Säure entsprach. Wir haben daher dem 1 ccm Blut eigentlich nicht 30, sondern 30,2 ccm n/50 Säure zugefügt. Die Anzahl der Kubikzentimeter der zurücktitrierten Säure haben wir daher nicht von 30, sondern 30,2 ccm subtrahiert.

Hiernach wurde das im Zentrifugierröhrchen zurückgebliebene Blut zentrifugiert und 1 ccm Plasma in ein Becherglas versetzt, die Pipette dreimal mit destilliertem Wasser durchgewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem im Becherglase befindlichen Plasma vereinigt. Hierauf setzten wir dem Plasma 15 ccm n/50 HCl und 10 ccm K_2HgJ_4 hinzu, filtrierten den Niederschlag, wuschen mit 80 bis 100 ccm destillierten Wassers und titrierten das Filtrat mit n/50 NaOH zurück, Indikator: alizarinsulfosaures Natrium. Die Zahl der Kubikzentimeter der zurücktitrierten Säure wurde jedoch nicht von 15, sondern von 15,3 ccm abgezogen auf Grund folgender Erwägung. Wenn das Verhältnis zwischen Formelementen und Plasma 50 : 50 wäre und die roten Blutkörperchen NaF überhaupt nicht durchließen, so müßte 1 ccm des auf die genannte Weise hergestellten Plasmas 0,02 g NaF enthalten. Das Verhältnis zwischen Formelementen und Plasma ist im Durchschnitt bei gesunden und kranken Kindern 36 : 64, es ist daher in 1 ccm Blut etwas mehr Plasma als Formelement enthalten, außerdem können auch die roten Blutkörperchen etwas NaF durchlassen. Wir kommen also der Wahrheit näher, wenn wir in 1 ccm Plasma bloß 0,015 g NaF annehmen. Der Säuregrad dieser Fluoridmenge entsprach 0,3 ccm n/50 Säure, wir haben daher dem Plasma nicht 15,

sondern 15,3 ccm n/50 Säure hinzugefügt und auch die Berechnung mit diesem Werte vollzogen.

Zur Bestimmung des Verhältnisses Plasma:Formelemente haben wir das Hämatokritverfahren angewendet. Behufs Verhinderung der Blutgerinnung ist es am zweckmäßigsten, bei dem Hämatokritverfahren Hirudin zu verwenden; nachdem jedoch die *Merck*sche Fabrik die Erzeugung eingestellt hat, konnten wir es beim besten Willen nicht beschaffen. Wir haben die Gerinnung mit Natriumcitrat in 0,5 proz. Konzentration verhindert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die Verteilung des Natriumcitrats zwischen Plasma und Formelementen nicht gleichmäßig ist, der größte Teil desselben bleibt im Plasma, und infolge der Hypertonie des Plasmas zeigen die roten Blutkörperchen eine gewisse Tendenz zur Schrumpfung. Der diesbezügliche Teil unserer Forschung besitzt eher relativen als absoluten Wert.

Nach Feststellung der Säurebindung von 1 ccm Plasma und 1 ccm Blut und des Verhältnisses zwischen Plasma : Formelemente konnte leicht berechnet werden, wieviel von der durch 1 ccm Blut gebundenen Säure auf das Plasma entfällt, die übriggebliebene Säure wurde von den Formelementen gebunden. Wenn z. B. 1 ccm Blut 14,08 ccm, 1 ccm Plasma 6,68 ccm n/50 Säure bindet und das Plasma : Formelementverhältnis 36 : 64 beträgt, so entfallen auf 0,64 ccm Plasma 4,28 ccm n/50 Säure, diesen Wert von 14,08 ccm abgezogen, entfallen auf 36 Vol.-Proz. Formelemente 9,80 ccm n/50 Säure und hiervon auf 1 Vol.-Proz. 0,272 ccm. Dieser Quotient, welcher die Menge der auf 1 Vol.-Proz. roter Blutkörperchen entfallenden Säure ausdrückt, könnte Säure-Erythrocytenquotient genannt werden, nachdem den größten Teil der Formelemente ohnehin rote Blutkörperchen bilden.

Wir haben bei 12 gesunden und 28 kranken Kindern von 8 bis 12 Jahren Untersuchungen vorgenommen.

Ergebnis.

1. Gesunde Kinder.

Nr.	Plasma : Formelementverhältnis	Blut-Säurebindung ccm	Plasma-Säurebindung ccm	Quotient
1	36 : 64	14,66	7,55	0,27
2	35 : 65	15,02	6,31	0,31
3	36 : 64	14,08	6,68	0,27
4	34 : 66	13,86	6,93	0,27
5	40 : 60	15,41	7,23	0,28
6	33 : 67	14,20	7,71	0,27
7	36 : 64	14,61	7,44	0,27
8	38 : 62	15,27	7,93	0,27
9	35 : 65	15,30	6,88	0,31
10	40 : 60	16,13	6,79	0,30
11	37 : 63	15,17	7,22	0,29
12	37 : 63	14,59	7,29	0,27

2. Kranke Kinder.

Nr.	Diagnose	Plasma : Formelementverhältnis	Blut-Säurebindung ccm	Plasma-Säurebindung ccm	Quotient
1	Pyopneumothorax	38 : 62	14,01	6,50	0,26
2	Tuberculosis pulmonum . .	31 : 69	14,11	7,87	0,28
3	Spondylitis dorsalis	37 : 63	13,50	6,58	0,25
4	„ „	31 : 69	14,50	7,88	0,29
5	Hyperplasia gland. peribronch.	37 : 63	13,62	7,03	0,25
6	Bronchitis tbc.	36 : 64	14,71	7,40	0,28
7	Peritonitis tbc.	35 : 65	15,52	7,83	0,30
8	„ „	29 : 71	13,00	7,30	0,27
9	„ „	33 : 67	14,36	8,11	0,27
10	Caries costae	36 : 64	11,94	5,94	0,23
11	Cystitis	35 : 65	14,49	7,65	0,27
12	Osteomyelitis chr.	27 : 73	10,37	5,21	0,24
13	Pleuritis exsud.	36 : 64	13,75	7,03	0,26
14	„ „	37 : 63	14,26	7,30	0,26
15	„ „	37 : 63	13,72	7,05	0,25
16	Polyarthritis rheumatica . .	32 : 68	12,89	8,92	0,21
17	„ „ . .	35 : 65	13,20	6,95	0,25
18	Stomatitis ulcerosa	37 : 63	14,34	7,81	0,28
19	Nephritis chronica	27 : 73	12,99	7,71	0,27
20	Malaria	32 : 68	13,35	6,02	0,29
21	„	33 : 67	14,81	7,14	0,30
22	Staus post enkephalitidem .	39 : 61	16,15	8,07	0,29
23	Haemophilia	32 : 68	12,82	7,49	0,24
24	Chorea minor	41 : 59	15,34	7,11	0,27
25	„ „	37 : 63	14,34	7,81	0,25
26	Tumor hypophyseos	37 : 63	14,88	7,75	0,27
27	Icterus haemolyticus	10 : 90	9,92	6,97	0,37
28	„ „	8 : 92	9,61	6,83	0,42

Betrachten wir die Ergebnisse der ersten Tabelle, so können wir folgendes konstatieren. Bei gesunden Kindern bindet 1 ccm Blut durchschnittlich 14 bis 15 ccm n/50 Säure, im Mittelwert 14,88 ccm, der niedrigste Wert ist 13,86 ccm, der höchste 16,13 ccm. Die Säurebindung des Plasmas schwankt um 7 ccm herum, Mittelwert 7,16 ccm. Es bindet daher 1 ccm Blut zweimal soviel Säure als 1 ccm Plasma. Der Säure-Erythrocytenquotient reicht von 0,27 bis 0,31. Bei der Säurebindung des Blutes spielen außer dem Alkali- und Eiweißgehalt des Plasmas die roten Blutkörperchen die Hauptrolle. Je größer der Gehalt an roten Blutkörperchen, desto mehr Säure kann das Blut binden. Die Säurebindungsfähigkeit des Blutes wächst oder sinkt entsprechend dem Gehalt an roten Blutkörperchen. Die Säurebindung der roten Blutkörperchen ist von drei Faktoren abhängig: von dem Alkali-, Hämoglobin- und Stromagehalt. Wir wissen, daß in den roten Blutkörperchen eine bedeutende Alkalimenge aufgespeichert ist, welche bei Zerstörung der roten Blutkörperchen frei wird und einen Teil der Säure bindet. Als wichtigster Faktor kann der zweite, der Hämoglobin-

gehalt, betrachtet werden. Der Hämoglobingehalt der roten Blutkörperchen ist beträchtlich. Das Hämoglobin als Protein bindet die Säure ebenso wie die übrigen Eiweißkörper des Blutes. Der größte Teil der von den roten Blutkörperchen gebundenen Säure entfällt gewiß auf das Hämoglobin. Je größer der Hämoglobingehalt der roten Blutkörperchen ist, desto größer ist ihre Säurebindungsfähigkeit. Der dritte Faktor, welcher bei der Säurebindung der roten Blutkörperchen mitwirkt, ist das Stroma. Das Stroma besteht zu $^2/_3$ Teilen aus Eiweiß, zu $^1/_3$ Teile aus Lipoiden. Auch die Stromaproteine üben auf die Säurebindung der roten Blutkörperchen einen gewissen Einfluß aus, die Lipoide vielleicht einen geringeren. Die Säurebindung des Blutes ist also wenigstens von fünf bis sechs Faktoren abhängig. Weitere Untersuchungen sind berufen, festzustellen, welche Wichtigkeit den einzelnen Faktoren bei der Säurebindung des Blutes bzw. der roten Blutkörperchen zukommt.

Aus den bei kranken Kindern erhaltenen Werten müssen zwei Gruppen hervorgehoben werden. In die eine Gruppe gehören die akuten und chronischen fieberhaften Krankheiten. In dieser Gruppe schwankt die durch 1 ccm Blut gebundene Säure um 13 bis 14 ccm herum, erreicht bloß in einem Falle 15 ccm und bleibt in drei Fällen unter 13 ccm. Die Menge der gebundenen Säure wechselt auch hier nach dem Blutkörperchenvolumen, bleibt aber in einem Teile der Fälle auch dann unter dem normalen Durchschnitt, wenn das Verhältnis zwischen Plasma und Formelementen den bei gesunden Kindern gefundenen Werten entspricht. In einzelnen Fällen entfällt von der durch das Blut gebundenen Säure überaus wenig auf die roten Blutkörperchen, was zur Folge hat, daß der Säure-Erythrocytenquotient eine gewisse sinkende Tendenz aufweist. Die Ursache betreffend, geben unsere Untersuchungen keine Aufklärung. Es ist möglich, daß in diesen Fällen (von akuten und chronischen fieberhaften Krankheiten) der Alkali- oder der Hämoglobingehalt der roten Blutkörperchen geringer ist als bei gesunden Kindern. Es muß auch damit gerechnet werden, daß in diesen Fällen beim Aufbau des Blutkörperchenstromas weniger Eiweiß mitwirkt als unter normalen Verhältnissen.

In die andere Gruppe gehören zwei Fälle von schwerer Anämie und Ikterus, wo die Säurebindung des Blutes sehr niedrig ist, ebenso das Volumen an roten Blutkörperchen, während der Säure-Erythrocytenquotient den Normalwert bedeutend übersteigt. Die Ursache muß in denselben Faktoren gesucht werden, welche wir vorhin erwähnten. Am nächsten liegt, daran zu denken, daß bei Fällen mit schwerer Anämie und Ikterus vielleicht der Hämoglobingehalt der einzelnen Blutkörperchen zu hoch ist, und dies zieht die abnorme Höhe des Quotienten nach sich.

In sonstigen Fällen mit Ausnahme einer Hämophilie haben wir eine Abweichung vom Normalen nicht bemerkt.

Zusammenfassung.

1. Wir haben die Gesamtsäurebindung des Blutes sowie des Plasmas nach der Methode *Bosányi-Csapó* und das Verhältnis zwischen Plasma und Formelementen mittels des Hämatokritverfahrens bei gesunden und kranken Kindern festgestellt.

2. Bei gesunden Kindern bindet 1 ccm Blut 14 bis 15 ccm, 1 ccm Plasma durchschnittlich 7 ccm n/50 Säure. Die Säurebindung des Blutes ist beiläufig doppelt so groß als die des Plasmas und wächst bzw. sinkt mit dem Gehalt an roten Blutkörperchen. Aus der Säurebindung des Blutes und des Plasmas sowie aus dem Verhältnis Plasma : Formelemente haben wir die auf 1 Vol.-Proz. roter Blutkörperchen entfallende Säuremenge errechnet und gefunden, daß dieselbe bei gesunden Kindern zwischen 0,27 bis 0,31 ccm n/50 Säure schwankt, welche Ziffer wir Säure-Erythrocytenquotient benannten.

3. Bei einigen an akuten und chronischen fieberhaften Krankheiten leidenden Kindern war sowohl die Gesamtsäurebindung des Blutes wie der Säure-Erythrocytenquotient vermindert, bei anderen dagegen vollkommen normal.

4. Bei Fällen von schwerer Anämie und Ikterus ist die Gesamtsäurebindung des Blutes niedrig, der auf die roten Blutkörperchen entfallende Teil im Verhältnis zum Blutkörperchenvolumen hoch, und infolgedessen übersteigt der Säure-Erythrocytenquotient den Normalwert bedeutend.

Die Mikrobestimmung des Sauerstoffgehaltes im Wasser.

Von

C. Risch (Bärwalde, Neumark).

(Eingegangen am 30. Juni 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die nachfolgend beschriebene Mikrobestimmung des Sauerstoffgehalts im Wasser basiert auf der bekannten vorzüglichen Methode der Sauerstoffbestimmung nach *Winkler*. Der Chemismus dieser Methode ist dabei unverändert geblieben, nur die Apparatur ist der Verwendung kleiner Wassermengen angepaßt.

Die Bestimmungsweise nach *Winkler* ist so elegant, daß eine Veränderung der Originalangaben von *Winkler* nur eine Verschlechterung der Resultate bedeuten kann. Wenn ich trotzdem eine Kleinapparatur vorschlage, so geschieht dies nur in Hinsicht darauf, daß bei experimentellen biologischen Arbeiten in gewissen Fällen die nach den *Winkler*schen Angaben geforderten Wassermengen den Untersuchungen ein Veto entgegensetzen. Z. B. ist es zuweilen undurchführbar, den Kulturen diese großen Wassermengen (etwa 250 ccm) zu entnehmen, ohne daß das ganze Experiment gefährdet wird. Sehr oft war man deshalb genötigt, den Versuch mit der Sauerstoffbestimmung abzuschließen. Und doch ist eine fortlaufende Kontrolle des O_2-Gehaltes oft äußerst erwünscht, wenn nicht sogar Vorbedingung für die restlose Lösung der gestellten Aufgabe.

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, den Sauerstoffgehalt einer bestimmten Stelle des Aquariums festzustellen, z. B. in der unmittelbaren Umgebung der zu untersuchenden Organismen. Es ist schlechterdings nicht möglich, einwandfreie Schlüsse aus Sauerstoffbestimmungen zu ziehen, die Wasser aus einer recht weiten Umgebung der Versuchsobjekte zur Grundlage haben. Es handelt sich bei diesen Analysen vor allen Dingen um eine einwandfreie Entnahme kleiner Wassermengen.

Noch schwieriger gestaltet sich die Lösung des Problems der Mikrosauerstoffschichtung im Wasser oberhalb von Bodenschlamm. Eine zweckentsprechende Entnahme des Untersuchungswassers ist hierzu erstes Erfordernis.

Diesen Forderungen des experimentierenden Hydrobiologen glaube ich durch meinen Mikrobestimmungsapparat gerecht zu werden.

Der Hauptsache nach besteht derselbe aus einer kombinierten Pipette, die, oben mit dem Finger verschlossen, an die Entnahmestelle

geführt wird. Durch Lüften des Fingers steigt das gewünschte Wasser in der Pipette empor und wird nun weiter mit dem Munde angesogen, bis es in den kugelförmig erweiterten Teil eingetreten ist. Damit gelangt das mit der Luft in Berührung gewesene Wasser in den oberen Teil der Pipette und wird für die Untersuchung ausgeschaltet. Das zu untersuchende Wasser selbst wird durch Schließen der beiden Hähne abgesperrt. Der Raum zwischen beiden Hähnen, ausschließlich der Menge, die in den Hahndurchlässen eingeschlossen ist, ist genau bestimmt und ein für allemal auf dem Rohre anzugeben. Nach Entfernung der Gummischläuche öffnet man den oberen Hahn und führt hintereinander mittels geeichter, kapillarartig ausgezogener Pipetten 0,15 ccm kaliumjodidhaltige 33⅓ proz. Natronlauge, darauf ebensoviel 33⅓ proz. Manganochloridlösung hinzu, indem man die Pipette jedesmal möglichst weit durch den Kanal des Hahnes hindurchführt. Nun wird der obere Hahn geschlossen, umgeschwenkt und 1 Stunde im Dunkeln in senkrechter Stellung beiseite gestellt. Nach dieser Zeit öffnet man wieder den oberen Hahn, führt 0,25 ccm konzentrierter Salzsäure ebenfalls mit einer Kapillarpipette ein, schließt den Hahn und löst den Niederschlag durch Umschwenken. Das Reaktionsgemisch läßt man dann in ein Becherglas fließen, spült mittels Spritzflasche mit wenig Wasser gut nach und titriert das ausgeschiedene

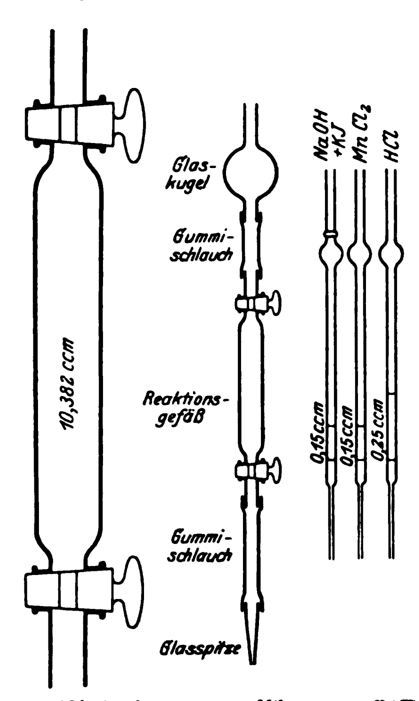


Abb. 1. Apparatur zur Mikrosauerstoffbestimmung im Wasser.

Jod, Stärkelösung als Indikator, mit n/100 Natriumthiosulfatlösung bis zur genauen Entfärbung. Hierzu bedient man sich einer Mikrobürette, die 2 bis 3 ccm enthält und in 0,01 ccm geteilt ist. Die Titration geschieht unter den als bekannt vorauszusetzenden Kautelen der Mikrotitration (Vermeidung großer Tropfen, von Temperaturänderungen durch Anfassen mit der Hand usw.).

Die stöchiometrische Berechnung geschieht in derselben Weise wie bei der *Winkler*schen Sauerstofflasche. Von dem angegebenen Rauminhalt des Reaktionsraumes werden 0,3 ccm für die hinzugefügten Reagenzien in Abzug gebracht. Im übrigen entspricht 1 ccm n/100

Natriumthiosulfatlösung 0,08 mg Sauerstoff. Es gilt also folgende Formel, wenn V der Rauminhalt der Reaktionspipette, n die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter n/100 Natriumthiosulfatlösung ist:

$$\text{mg } O_2 \text{ im Liter} = \frac{80 \cdot n}{V - 0{,}3}\,{}^{1)}.$$

Liegt die Entnahmestelle in tieferen Wasserschichten des Aquariums, so verwendet man einen entsprechend langen Gummischlauch oder besser ein abgepaßtes Glasrohr, das mittels kleiner Gummischlauchstücke fest mit dem Hahnteil und der Glasspitze verbunden wird. Auf diese Weise ist eine sichere Führung der ganzen Entnahmepipette gewährleistet.

Die Hähne pflegen stark eingefettet zu sein. Das Fett ist vor der Verwendung gründlich durch Benzin, Chloroform, Äther und Lauge zu entfernen. Geringe Fettspuren an den Wandungen des Reaktionsraumes halten beim Hochsaugen oft hartnäckig Luftbläschen zurück.

Um sicher Luftzutritt während des Absitzenlassens des Niederschlages zu vermeiden, stellt man eventuell den Reaktionszylinder in ein Gefäß mit Wasser gleicher Temperatur. Bei gut schließenden Hähnen und Ausschluß von Temperaturerniedrigungen erübrigt sich diese Vorsicht.

Die mit dem Apparat erhaltenen Resultate weichen bei genauem Arbeiten nur um ein Geringes von denen mit der Sauerstoffflasche gewonnenen ab. Gewöhnlich erhält man eine etwas größere Menge Sauerstoff pro Liter. Die größte Abweichung betrug bei fünf Bestimmungen + 0,1 mg pro Liter. Ich führe dies darauf zurück, daß bei der Mikrobestimmung verhältnismäßig mehr von der Natriumthiosulfatlösung für den Umschlag des Indikators verbraucht wird.

Die Apparatur ist angefertigt von den Vereinigten Lausitzer Glaswerken, Berlin SO 36, Lausitzer Straße 10.

Literatur.

L. W. Winkler, Über die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffs. Zeitschr. f. analyt. Chem. 1914.

---

[1]) Benutzt man stets denselben Apparat, so kann man sich den Faktor $f = \frac{80}{V - 0{,}3}$ berechnen und gelangt dann zu der einfachen Formel $f \cdot n$.

Zur Frage nach der Rolle des „Donnanschen Membrangleichgewichts" bei osmotischen Vorgängen in lebenden Zellen.

Von

Wl. S. und W. W. Butkewitsch.

(Aus der landwirtschaftlichen Akademie Petrowsko-Rasumowskoje, Moskau.)

(Eingegangen am 30. Juni 1925.)

Bei der Erklärung der osmotischen Vorgänge in lebenden Zellen wurde noch unlängst die Ansicht vertreten, daß der Konzentrationsausgleich der diffusiblen Stoffe eine unentbehrliche Bedingung für das osmotische Gleichgewicht bilden müsse. Die nähere Untersuchung über die Aufnahme der Salze aus ihren Lösungen durch die lebenden Zellen und der Vergleich des Salzgehalts in den Zellen und in der umgebenden Lösung führte aber durchaus nicht immer zu Ergebnissen, die mit der soeben erwähnten Auffassung übereinstimmten. Die hierüber angestellten Beobachtungen haben ergeben, daß die Ionen nicht im gleichen Verhältnis in die Zelle hineinwandern, das sie in der Außenflüssigkeit besitzen, ferner, daß die durch die Zelle aufgenommenen Ionen oft nicht die gleiche Konzentration wie in der Lösung zeigen[1]). Dabei kann das Verhältnis zwischen beiden Konzentrationen, „das Absorptionsverhältnis"[2]), bald größer, bald kleiner als 1 sein; meist erweist sich eine bestimmte Abhängigkeit vom Salzgehalt der zu untersuchenden Lösung, indem es sich mit der Konzentration derselben regelmäßig verändert[3]).

Anfangs wurden diese Tatsachen, die der allgemein vertretenen Auffassung des osmotischen Gleichgewichts nicht entsprachen, zum

---

[1]) Hierher gehören die Arbeiten von *Nathansohn*, *Meurer*, *Ruhland*, *Pantanelli*, *Stiles*, *Redfern* u. a.

[2]) *Stiles* bezeichnet dieses Verhältnis als „absorption ratio". *W. Stiles* and *F. Kidd*, Proc. of Roy. Soc. **90**, 448, 487, **1919**.

[3]) Vgl. *W. Stiles*, Ann. of Botany **38**, 617, **1924**.

Teil einfach vernachlässigt und der mangelhaften Versuchsausführung zugeschrieben, teils durch die in den Zellen vorgehenden Veränderungen erklärt. So nahm man, im Falle daß die Außenlösung eine höhere Konzentration als in der Zelle aufwies, an, daß die Plasmahaut ihre ursprüngliche Durchlässigkeit für den betreffenden Stoff einbüßt, bevor das osmotische Gleichgewicht erreicht wird. Im umgekehrten Falle, d. h., wenn eine verhältnismäßige Anhäufung des Stoffes in den Zellen erfolgt, glaubte man, daß sich der Stoff mit den Zellbestandteilen verbindet oder an sie adsorbiert wird. Diese Erklärungsweise hatte aber nicht immer eine hinreichende Grundlage, und in gewissen Fällen erwies sie sich auch als geradezu untauglich. Ein Konzentrationsunterschied außerhalb und innerhalb der Zelle ließ sich bei Gleichgewicht auch dann nachweisen, wenn die Ionen auch in der Zelle in demselben freien Zustande wie in der Außenlösung blieben. Einen derartigen Fall bilden z. B. die Blutkörperchen in bezug auf das Blutserum[1]), und die Zellen der Meeralgen in bezug auf das Meerwasser[2]). Auf diese Weise entstand natürlich die Frage nach den in den lebenden Zellen vorhandenen Bedingungen, welche das Zustandekommen des Gleichgewichts unter Ausgleich der Konzentrationsunterschiede einschränken.

Eine dieser Bedingungen, die man meist in lebenden Zellen antrifft, wurde von *Donnan* im Jahre 1911 aufgefunden und in einer Mitteilung[3]) erörtert, die seine Theorie des Membrangleichgewichts ohne Ausgleich der Konzentrationen enthielt. Diese Theorie, die anfangs nicht Gegenstand besonderer Aufmerksamkeit war, erwarb sich erst in neuerer Zeit größere Bekanntheit, nachdem *Procter* und *Wilson* und darauf *J. Loeb* sie zur Erklärung der Kolloideigenschaften der Eiweißstoffe angewandt hatten.

Die von *Donnan* in seiner Lehre vorausgesetzte Bedingung besteht bekanntlich darin, daß die zwei Elektrolytlösungen trennende Membran für die eine Art der in den Lösungen befindlichen Ionen undurchlässig ist. Nehmen wir z. B. an, daß das System die Salze NaCl und NaR enthält, die in die Ionen Na^+ und Cl^- sowie Na^+ und R^- dissoziiert sind, und daß die Membran für Na^+ und Cl^- permeabel und für R^- impermeabel ist, so können wir — von dem weiter unten angegebenen Schema ausgehend, in welchem die kleinen Buchstaben molare Konzentrationen der entsprechenden Ionen bedeuten —, die von *Donnan* auf Grund thermodynamischer Erwägungen abgeleiteten Bedingungen des Gleich-

---

[1]) *R. Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., 1922, S. 465.

[2]) *W. J. V. Osterhout*, Journ. of gener. Physiol. **5**, 225, 1922.

[3]) *F. G. Donnan*, Zeitschr. f. Elektrochem. **17**, 572, 1911; *F. G. Donnan* and *A. B. Harris*, Journ. of Chem. Soc. **99**, 1554, 1911.

gewichts in dem System durch folgende Gleichung zum Ausdruck bringen:

$$\begin{array}{r|l} z\,R^- & Cl^-\,x \\ y\,Cl^- & Na^+\,x \\ y + z\,Na^+ & \\ I & II \end{array} \qquad x^2 = y\,(y + z)$$

Aus dieser Gleichung geht hervor, daß x und y bei den gegebenen Bedingungen nicht gleich sein können, und daß die Divergenz zwischen ihnen um so beträchtlicher sein muß, je größer z ist, d. h. je stärker die relative Konzentration derjenigen Ionen ist, für welche die Membran undurchlässig ist. x wird gleich y nur dann, wenn z gleich 0 ist; nur wenn die nichtdiffusiblen R-Ionen völlig fehlen, ist also ein osmotisches Gleichgewicht mit Konzentrationsausgleich der diffusiblen Ionen vorhanden. Diese ungleichartige Verteilung diffusibler Ionen im Gleichgewichtszustand bei Gegenwart nichtdiffusibler Ionen — die Verteilung, die durch das Produkt aus den Konzentrationen der entgegengesetzt geladenen diffusiblen Ionenpaare auf der einen und der anderen Seite der Membran bestimmt wird —, ist das Wesen des von *Donnan* festgestellten Prinzips.

Die Verwirklichung dieses Prinzips wurde experimentell durch die Versuche *Donnans* und seiner Mitarbeiter[1]) mit verschiedenen Membranen, unter anderem auch mit einer Amylalkoholmembran (KCl und LiCl) erreicht. Die Versuche mit letzterer ergeben, daß sich das *Donnan*sche Prinzip nicht nur dann geltend macht, wenn diffusible Ionen durch Kapillarrisse der Membran wie durch Sieblöcher eindringen, sondern auch dann, wenn das Hinüberwandern durch die Membran auf dem Wege der Lösung in ihrer Substanz geschieht.

Zahlreiche Beweise der Verwirklichung des *Donnan*schen Membrangleichgewichts wurden weiter durch die Versuche von *Procter* und *Wilson*[2]) und besonders von *Loeb*[3]) auf dem Gebiete des Verhaltens der Eiweißkörper zu Säuren, Basen und Salzen gegeben. Diese Versuche stellten auch fest, daß das *Donnan*sche Gleichgewicht nicht nur in den durch eine Membran getrennten Lösungen eintritt, sondern auch in elektrolytartigen Gelen, z. B. von Gelatine auf der sauren oder alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes.

Bei der theoretischen Begründung seines Prinzips ging *Donnan* von thermodynamischen Erwägungen aus. Später zeigte *Wilson*, daß

---

[1]) *F. G. Donnan* and *A. B. Harris*, Journ. of Chem. Soc. **99**, 1554, 1911; *Donnan* and *A. J. Allmond*, ebendaselbst **105**, 1941, 1914; *Donnan* and *G. M. Green*, Proc. of Roy. Soc. A. **90**, 450, 1914; *Donnan* and *W. E. Garner*, Journ. of Chem. Soc. **115**, 1313, 1919.

[2]) *H. R. Procter*, Journ. of Chem. Soc. **105**, 313, 1914; *Procter* and *J. A. Wilson*, ebendaselbst **109**, 307, 1916.

[3]) *J. Loeb*, Proteins and the theorie of colloidal behavior. 1922.

dieses Prinzip auch auf Grund kinetischer Erwägungen leicht abgeleitet werden kann.

„Wenn die entgegengesetzt geladenen Ionen — sagt er — von einer Phase in die andere übergehen, müssen sie es paarweise tun, da sie sonst starke elektrostatische Kräfte hervorrufen würden, welche ihre freie Diffusion verhindern würden. Aus diesem Grunde könnte ein Natrium- und Chlorion, das allein auf die Membran stößt, nicht hindurchgehen. Die Membran ist aber sowohl für Na^+ wie für Cl^- durchlässig, wenn also zwei entgegengesetzt geladene Ionen zusammen auf die Membran stoßen, so kann sie nichts am Durchtritt und am Hinüberwandern in die Lösung auf die entgegengesetzte Seite hindern. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Ionen von einer Lösung in die andere hängt daher von der Häufigkeit ab, mit welcher sie zufällig paarweise auf die Membran stoßen; diese wiederum entspricht dem Produkt ihrer Konzentrationen. Bei Gleichgewicht gehen genau gleichviel Na^+ und Cl^--Ionen aus Lösung II in Lösung I wie aus Lösung I in Lösung II, d. h. das Produkt der Konzentrationen dieser Ionen hat in beiden Lösungen den gleichen Wert“[1]).

Von derartigen Erwägungen ausgehend, zeigte *Wilson* weiter, daß die Gleichheit der Konzentrationsprodukte für alle im System befindlichen diffusiblen Ionen gilt, und daß, wenn ein mehrwertiges Ion unter den diffusiblen Ionen vorhanden ist, die Potenz der Konzentrationen der einwertigen Ionen der höheren Valenz gemäß gesteigert werden muß[2]). Für einwertige Ionen stellt die Theorie fest, daß das Konzentrationsverhältnis der Ionen gleicher Ladung auf der einen Seite der Membran gleich dem der entsprechenden Ionen auf der anderen Seite sein muß, wobei sich die entgegengesetzt geladenen Ionen auf der einen und der anderen Seite der Membran im umgekehrten Verhältnis verteilen. Nehmen wir z. B. an, daß die Anionen A, B, C usw. und die Kationen M, N, O usw. im System vorhanden sind, und daß die entsprechenden Konzentrationen auf der einen Seite der Membran $a, b, c \ldots, m, n, o \ldots$ und auf der anderen $a', b', c' \ldots, m', n', o' \ldots$ sind, so müssen folgende Verhältnisse statthaben:

$$\frac{a}{a'} = \frac{b}{b'} = \frac{c}{c'} \cdots = \frac{m'}{m} = \frac{n'}{n} = \frac{o'}{o} \cdots$$

Donnan hat schon selbst die mannigfaltige Anwendung vorausgesehen, die das von ihm festgestellte Prinzip des Membrangleichgewichts in der Physiologie finden kann.

---

[1]) *J. A. Wilson*, The chemistry leather manufacture 1923, S. 95.

[2]) Wenn das einwertige Kation Na^+ in unserem Schema durch ein zweiwertiges M^{++} ersetzt wird, so nimmt die *Donnan*sche Gleichung die Gestalt $x^2 . x = y^2(y + z)$ oder $x^3 = y^2(y + z)$ an. Wenn das nicht diffusible Ion R^- zwei- oder mehrwertig wird, so kann die Gleichung ihre ursprüngliche Form bewahren, aber z muß dann nicht molare, sondern äquivalente oder normale Konzentration bedeuten.

„Diese Arbeit — schreibt er in seiner Mitteilung vom Jahre 1911 — enthält einen Versuch, Ionengleichgewichte zu beschreiben, wie sie eintreten müssen, wenn bestimmte Ionen (oder ihre entsprechenden nicht dissoziierten Salze) nicht durch eine Membran diffundieren können. Solche Gleichgewichte sind von großer Bedeutung sowohl für die Theorie der Dialyse und der Kolloide wie für die Mechanismen der Zellen und für die allgemeine Physiologie."

Für das Zustandekommen des *Donnan*schen Gleichgewichts ohne Konzentrationsausgleich ist die Anwesenheit von nichtdiffusiblen Ionen maßgebend, und diese Bedingung liegt meist in den lebenden Zellen vor. Die Rolle dialysierunfähiger Ionen können dabei nicht nur die Ionen der kolloiden Ampholyte, wie z. B. der Eiweißkörper, der Phosphatide und gewisser anderer in den Zellen befindlicher Kolloidverbindungen spielen, sondern auch die kristalloiden, molekulargelösten Ionen, da die Plasmamembranen auch für diese undurchlässig sein können. Zu den Ionen der letzteren Kategorie können z. B. die Anionen der im Zellsaft der Pflanzenzellen meist befindlichen organischen Säuren und ihrer Salze wie auch wahrscheinlich gewisse Mineralionen gehören.

In einer seiner letzteren Arbeiten zeigte *J. Loeb*, daß die Membran der *Fundulus*-Eier bei einem gewissen Gehalt der Lösung an K-, Na- und Ca-Salzen undurchlässig für Na- und Ca-Ionen, aber leicht durchlässig für K-Ionen wird[1]). In diesem Falle sind die Bedingungen für das Eintreten des *Donnan*schen Membrangleichgewichts vorhanden, wobei die Na- und Ca-Ionen als dialysierunfähige Ionen fungieren können. Derartige Fälle sind auch in bezug auf die Salze möglich, die sich in der Zelle selbst, z. B. im Zellsaft der vakuolisierten Zellen, befinden. Ist die Plasmahaut für die Anionen oder Kationen dieser Salze impermeabel, so müssen sie eine Wirkung in bezug auf die Aufnahme der Salze von außen ausüben, indem die Grenzen der etwaigen Anhäufung ihrer Ionen in der Zelle erweitert oder verengert werden. Diese Einwirkung kann in weit beträchtlicherem Maßstabe in Erscheinung treten als der Einfluß der in der Zelle vorkommenden Eiweiß- und anderen Kolloidionen[2]). Die nicht diffusiblen Ionen, seien sie im Innern der Zelle oder in der Außenlösung vorhanden, können nicht nur die Endverteilung der diffusiblen Ionen zwischen der Zelle und Außenlösung bei Gleichgewicht, sondern auch die vorhergehende Verschiebung derselben beeinflussen. Es ist zu erwarten, daß die Geschwindigkeit des zum Gleichgewicht führenden Vorgangs, d. h. der Verschiebung

---

[1]) *J. Loeb*, Journ. of gener. Physiol. 5, 231, 1922.

[2]) *R. Höber* (Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., S. 459, 1922) trägt nur diesen Ionen Rechnung, wenn er zu dem Schlusse kommt, daß das *Donnan*sche Membrangleichgewicht keinen bedeutenden Einfluß auf die Verteilung der Salze in lebenden Zellen ausüben kann.

der diffusiblen Ionen, mit der Erweiterung bzw. Verengerung der Grenzen der etwaigen Anhäufung, d. h. mit der Entfernung bzw. Annäherung des Gleichgewichtsmoments, auch entsprechend zu- bzw. abnehmen muß.

Die Arbeiten von *J. Loeb*, welche die Bedeutung des *Donnan*schen Membrangleichgewichts in der Kolloidchemie der Eiweißkörper hervorhoben, veranlaßten in neuester Zeit die Ausführung tierphysiologischer Versuche, um die Theorie dieses Gleichgewichts zur Erläuterung der Verteilung der Elektrolyte im Blute zwischen Blutzellen und Blutserum und zur Erklärung gewisser, an diese Verteilung geknüpfter Erscheinungen anzuwenden. Bei der Darlegung der auf diesem Gebiet erreichten Erfolge spricht sich *Hitchcock*[1]) auf folgende Weise aus:

„Die erfolgreiche Anwendung der Theorie auf die Physiologie des Blutes weist darauf hin, daß *Donnan* mit der Annahme der Bedeutung seiner Theorie für die Biologie ebenso recht hatte wie *Loeb* mit seiner Behauptung, daß diese Theorie eine der Grundlagen sein wird, auf denen sich die moderne Physiologie wird aufbauen müssen."

Das *Donnan*sche Gleichgewicht stellt einen neuen Faktor dar, der für den Salzaustausch in den lebenden Zellen bis zu einem gewissen Grade maßgebend sein muß und der bisher nicht in Betracht gezogen wurde. Diesem Faktor muß man auch bei der Analyse der Bedingungen Rechnung tragen, die die Tätigkeit der Wurzelzellen bei der Aufnahme der Salze aus ihren Lösungen beeinflussen können. Die Einwirkung von nicht diffusiblen Ionen kann dabei von den Wurzelzellen selbst wie von der sie umgebenden Außenlösung ausgehen, wenn diese solche Ionen enthält.

Bei den weiter unten erörterten Versuchen stellten wir uns die Aufgabe, die Einwirkung von kolloidaler Kieselsäure in bezug auf die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Wurzelzellen zu verfolgen.

Zum Schluß muß man bemerken, daß das *Donnan*sche Membrangleichgewicht freilich nicht alle Bedingungen erschöpft, die für die Verteilung der Elektrolyte in den lebenden Zellen maßgebend sein können. Die Verschiebung der Ionen durch die Plasmamembranen und ihre Verteilung in den Zellen wird auch anderen Einwirkungen ausgesetzt.

Aus jedem Gemenge von Elektrolyten mit Ionen verschiedener Beweglichkeit werden diese die für sie durchlässige Membran mit verschiedener Geschwindigkeit passieren. Auf Grund derselben elektrostatischen und kinetischen Erwägungen, die zur Erklärung der *Donnan*schen Gleichung von *Wilson* angewandt wurden, ergibt sich, daß die Ionenpaare von höherer Beweglichkeit die Membran in verhältnismäßig größerer Menge passieren müssen, und daß das Hinüberwandern

[1]) *D. J. Hitchcock*, Ergebnisse d. Physiol. **23**, 274, 1924.

des in der Lösung vorhandenen Elektrolyts auf die entgegengesetzte Seite der Membran durch Einführung eines anderen Elektrolyts gefördert werden muß, wenn dieser letztere ein mit dem ersten gemeinsames Ion besitzt. Es ist weiter überhaupt anzunehmen, daß die Diffusionsgeschwindigkeit jedes Ions mit der Konzentrationserhöhung von entgegengesetzt geladenen diffusiblen Ionen zunehmen muß[1]), wobei die Wirkung ihres Einflusses in dieser Richtung um so bedeutender sein wird, je größer ihre Beweglichkeit ist. Da H- und OH-Ionen die höchste Beweglichkeit besitzen, ist es verständlich, daß die Säuren die Diffusion der Anionen und die Alkalien die der Kationen besonders befördern müssen.

Den Erscheinungen dieser Kategorie scheinen sich auch diejenigen zu nähern, die *P. Girard* bei seinen Versuchen über die Einwirkung von Säuren und Basen auf die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Salzionen durch Tiermembranen beobachtete, und die er als ein Ergebnis von Veränderungen in der Membranladung zu erläutern geneigt ist[2]).

Die soeben erörterten Fälle der Veränderungen in der Diffusionsgeschwindigkeit der Ionen sind nicht an die Verschiebung des Gleichgewichtspunkts geknüpft, der hier zu allerletzt unter Konzentrationsausgleich aller diffusiblen Ionen erreicht wird, und die ungleiche Verteilung der Ionen kann hier nur als eine intermediäre Stufe des Diffusionsvorgangs betrachtet werden.

Die soeben besprochenen Erscheinungen sowie diejenigen, die mit dem *Donnan*schen Membrangleichgewicht verbunden sind, können sich in den lebenden Zellen zusammen mit den Veränderungen im Zustande der Plasmamembranen und der Permeabilität abspielen[3]).

Eine besondere Kategorie der Erscheinungen, die mit der „selektiven" Permeabilität der Membranen im Zusammenhang stehen, haben wir in dem Verhalten der lebenden Zellen zu schwachen Säuren und Basen und zu ihren Salzen, denen eine stark ausgeprägte Neigung zu hydrolytischer Dissoziation eigentümlich ist. Die Besonderheiten

---

[1]) Dadurch erklärt sich vielleicht die noch von *Hellriegel* und seinen Mitarbeitern (1898) und neuerdings von *Breaseale* (1924) beobachtete Erscheinung, daß die Aufnahme von K-Salzen durch die Pflanzen befördert wird, wenn der Nährlösung Na-Salze zugesetzt worden sind. Vgl. *O. Lemmerman* und *H. Wiessman*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung A. **4**, H. 5, 1925.

[2]) *P. Girard* und Mitarbeiter, C. r. **148**, 1047, 1909; **170**, 821, 1920; **175**, 183, 1922.

[3]) So stellte *Loeb* z. B. fest, daß Chloride die Diffusion der Salzsäure durch Kollodiummembran beschleunigen und das Eindringen derselben in Funduluseier verzögern. *J. Loeb*, Journ. of gener. Physiol. **5**, 231, 255. 1922; vgl. auch *W. J. V. Osterhout*, Journ. of biol. Chem. **19**, 335, 493, 517, 1915.

dieser Erscheinungen beruhen auf verhältnismäßig höherer Permeabilität der lebenden Membranen und des Protoplasmas für die nicht dissoziierten Säuren und Basen[1]), wodurch die höhere physiologische Aktivität der schwachen Säuren und Basen im Vergleich mit den starken verursacht wird[2]). Die Bedingungen, welche die Bildung der undissoziierten Moleküle begünstigen, beschleunigen den Übergang derselben auf die andere Seite der für sie leicht durchlässigen Membran, wo sich die entsprechenden Säuren und Basen um so mehr anhäufen, je mehr die auf dieser Seite vorhandenen Bedingungen die elektrolytische Dissoziation befördern. Dadurch erklärt sich der Einfluß der Reaktion der Lösung auf die Aufnahme schwacher Säuren und Basen aus ihren Lösungen und aus Lösungen ihrer Salze durch die lebenden Zellen, und zwar derart, daß eine Herabsetzung des p_H die Aufnahme der Säuren, und eine Steigerung desselben die der Basen fördert. Dieselben Bedingungen scheinen auch für die Verteilung der basischen und sauren Farbstoffe maßgebend zu sein[3]).

Es wurde schon oben darauf hingewiesen, daß man bei Betrachtung der osmotischen Erscheinungen in den lebenden Zellen nicht nur den Einwirkungen Rechnung tragen muß, die unmittelbar von den durch die Membran getrennten Lösungen ausgehen, sondern auch denjenigen, die sich an die durch den Einfluß dieser letzteren verursachten Veränderungen in der Membran selbst knüpfen. Diese Veränderungen im Zustande der Membran können ihre Permeabilität für verschiedene Stoffe in ungleichem Grade beeinflussen, wobei es auch vorkommen kann, daß die Abnahme der Permeabilität für den einen Stoff mit der Zunahme für einen anderen verbunden ist[4]).

Bei den lebenden Membranen kann außerdem noch eine „irreziproke“ Permeabilität zum Vorschein kommen, die sich in der un-

---

[1]) Für diese Annahme sprechen die Beobachtungen von *Overton*, *Ruhland*, *Troendle*, *Harvey*, *Brenner*, *Loeb*, *Wertheimer* u. a. Hierher gehört auch die von *Jacobs* auf lebenden Zellen beobachtete Erscheinung der einseitigen Aufnahme von NH_3 und CO_2 aus Ammonium- und Kohlensäuresalzen. *M. H. Jacobs*, Amer. Journ. of Physiol. **51**, 321, 1920; Journ. of gener. Physiol. **5**, 181, 1922.

[2]) *J. Loeb*, Artificial parthenogenesis and fertilization 1913; Journ. of gener. Physiol. **5**, 231, 1922; *F. Gueyland* et *M. Deval*, C. r. **175**, 1243, 1922 (Einwirkung von Säuren auf Fische).

[3]) Entsprechende Angaben über den Einfluß der Reaktion der Lösung auf die Aufnahme der basischen und sauren Farbstoffe durch die Zellen finden sich in den Arbeiten von *Harvey* (1911), *Endler* (1912), *Rohde* (1917), *Collander* (1921), *Nirenstein* (1920), *Irvin* (1922). Vgl. besonders *M. Irvin*, Journ. of gener. Physiol. **5**, 223, 1922; auch *E. Wertheimer*, Pflügers Arch. **200**, 354, 1923.

[4]) Vgl. z. B. *J. Loeb*, Journ. of gener. Physiol. **5**, 231, 1922; *E. Wertheimer*, Pflügers Arch. **206**, 162, 1924.

gleichen Fähigkeit äußert, die Stoffe in zwei entgegengesetzten Richtungen durchzulassen, und die mit einer ungleichartig geschichteten Struktur der Membranen in Verbindung zu stehen scheint. Die zuerst von *Cohnheim* (1899) und von *Hamburger* (1908) für mucosa des Dünndarms festgestellte „irreziproke" Permeabilität wurde unlängst näher von *Wertheimer*[1]) auf Froschhaut untersucht. Die irreziproke Permeabilität erweist sich bei Froschhautmembranen nicht als unspezifische Eigenschaft, indem sie für verschiedene Stoffe verschieden ist und sich in Abhängigkeit von den die Membran umgebenden Lösungen ändert. Eine irreziproke Permeabilität, insoweit sie mit der geschichteten Struktur der Membran in Zusammenhang steht, ist wahrscheinlich, wie *Wertheimer* meint, auch den Plasmamembranen eigentümlich, da diese ebenfalls eine solche Struktur besitzen.

Wenn die Membran eine irreziproke Permeabilität für die in den Lösungen befindlichen Ionen besitzt, so muß man in die Gleichung des Membrangleichgewichts außer dem Konzentrationsprodukt der diffusiblen Ionen einen Faktor einsetzen, der die Geschwindigkeit, mit der die entsprechenden Ionenpaare die Membran passieren, angibt. Nehmen wir z. B. an, daß in den durch die Membran getrennten Lösungen u. a. Na- und Cl-Ionen vorkommen, für welche die Membran in entgegengesetzten Richtungen ungleich permeabel ist, so läßt sich die Gleichung des Gleichgewichtszustandes dem angegebenen Schema gemäß

n' Na^+	Na^+ n''
cl' Cl^-	Cl^- cl''
p' —	→
←	— p''
I	II

auf folgende Weise zum Ausdruck bringen:

$$n' \,.\, cl' \,.\, p' = n'' \,.\, cl'' \,.\, p'',$$

wo n und cl Konzentrationen der Na- und Cl-Ionen bedeuten und p einen Permeabilitätsfaktor darstellt. Aus dieser Gleichung ergibt sich:

$$\frac{p'}{p''} = \frac{n'' \,.\, cl''}{n' \,.\, cl'}.$$

Dieses Verhältnis läßt sich auffinden, wenn die Konzentrationen der Na- und Cl-Ionen auf den entgegengesetzten Seiten der Membran bekannt sind.

Osterhout[2]) unterwarf den Zellsaft der Meeralge *Valonia* und das Meerwasser, aus dem die Alge stammte, einer Analyse und erhielt folgende Resultate:

---

[1]) *E. Wertheimer*, Pflügers Arch. **199**, 383; **200**, 82, 354; **201**, 488. 1923; **203**, 542; **206**, 162, 1924.

[2]) *W. J. V. Osterhout*, Journ. of gener. Physiol. **5**, 225, 1922.

	Prom.		Mole in 1000 ccm *)	
	Meerwasser	Zellsaft	Meerwasser	Zellsaft
Cl	19,605	21,183	0,560	0,605
Na	10,919	2,072	0,475	0,090
K	0,464	20,143	0,012	0,516
Ca	0,453	0,069	0,0113	0,0017
Mg	1,309	shw. Spuren	0,055	Spuren
SO_4	3,327	0,005	0,035	0,00005
Fester Rückstand	—	45,228	—	—
Organ. Stoffe	—	1,433	—	—

*) Die hier angegebenen molaren Konzentrationen haben wir auf Grund der Analysenergebnisse *Osterhouts* berechnet.

Indem wir von diesen Angaben und von der soeben angeführten Gleichung ausgehen und die Verschiebungsgeschwindigkeit der Ionen in der Plasmahaut von außen nach innen und von innen nach außen durch p_a und p_i bezeichnen, so erhalten wir

$$\text{für Na-Ionen } \frac{p_a}{p_i} = \frac{0{,}09 \,.\, 0{,}605}{0{,}475 \,.\, 0{,}56} = 0{,}2 = 1/5$$

und

$$\text{für K-Ionen } \frac{p_a}{p_i} = \frac{0{,}516 \,.\, 0{,}605}{0{,}012 \,.\, 0{,}56} = 45{,}6.$$

Im gegebenen Falle ist also die Permeabilität der Plasmamembran von außen nach innen für Na als fünfmal kleiner und für K als 45mal größer als die in entgegengesetzter Richtung aufzufassen[1]).

Wenn den lebenden Plasmamembranen in der Tat eine irreziproke Permeabilität zukommt, so muß auch in der *Donnan*schen Gleichung bei ihrer Anwendung für lebende Zellen ein Permeabilitätsfaktor eingeführt werden, da das Hinüberwandern der entgegengesetzt geladenen Ionenpaare von einer Lösung in die andere dann nicht nur von der Häufigkeit des Zusammentreffens dieser Ionen an der Membran, sondern auch von der verhältnismäßigen Permeabilität dieser letzteren für die Ionen abhängig wird. Die Gleichung der Membrangleichgewichte nimmt also die Gestalt $y \,.\, (y + z) \,.\, p' = x^2 \,.\, p''$ an, und die ursprüngliche *Donnan*sche Gleichung $y\,(y + z) = x^2$ gilt nur dann, wenn p' gleich p'' ist. Ist das nicht der Fall, so kann das Gleichgewicht ohne Konzentrationsausgleich auch in Abwesenheit von nicht diffusiblen Ionen zustande kommen.

---

[1]) Dabei ist der Dissoziationsgrad der Salze nicht in Betracht gezogen worden, und die auf der Annahme einer irreziproken Permeabilität beruhende Erklärung ist nur die eine der möglichen. Für die Verteilung der Salze kann auch ihre verschiedene Dissoziation auf den entgegengesetzten Seiten der Membran und deren verschiedene Permeabilität für die undissoziierten Moleküle und für die Ionen maßgebend sein.

Der Einfluß kolloidaler Kieselsäure in bezug auf die Ausnutzung der Phosphorsäure durch die Pflanzen.

Wenn wir in die Lösung irgend eines die Zelle umgebenden Salzes, z. B. NaCl, dessen Ionen durch die Zellmembran zu diffundieren vermögen, ein anderes Salz, MR, hineinbringen, von dessen Ionen nur das Kation M^+ diffusibel ist, so wird das Gleichgewicht unter dem Einfluß des nicht diffusiblen Anions R^- nach dem *Donnan*schen Prinzip derart verschoben, daß die Aufnahme des diffusiblen Anions Cl^- befördert wird. Diese Verschiebung muß in um so bedeutenderem Maße in Erscheinung treten, je größer die relative Menge des Salzes MR ist. Nehmen wir an, daß die Lösung ein hinreichend großes Volumen besitzt, um die Veränderungen, die in ihr infolge der Aufnahme der Salze durch die Zelle eintreten, vernachlässigen zu können, so lassen sich die Konzentrationsverhältnisse in der Zelle und in der Lösung bei Gleichgewicht durch folgende Gleichungen ausdrücken (die kleinen Buchstaben bedeuten molare Konzentrationen der entsprechenden Ionen in der Zelle):

für Cl- und Na-Ionen $cl \,.\, n = [\mathrm{NaCl}] \,.\, [\mathrm{NaCl}]$,
für Cl- und M-Ionen $cl \,.\, m = [\mathrm{NaCl}] \,.\, [\mathrm{MR}]$.

Summiert man diese Gleichungen, so ergibt sich

$$cl \,.\, (n + m) = [\mathrm{NaCl}] \,.\, ([\mathrm{NaCl}] + [\mathrm{MR}]).$$

Da $n + m = cl$ ist, so haben wir

$$cl = \sqrt{[\mathrm{NaCl}] \,.\, ([\mathrm{NaCl}]) + [\mathrm{MR}])}.$$

Nimmt man die molare Konzentration von NaCl in der Lösung gleich 1 an und variiert ihren relativen Gehalt an MR, so ergeben sich folgende Werte für entsprechende Konzentrationen der Cl-Ionen in der Zelle (cl).

$[MR]:[\mathrm{NaCl}] =$	0	3	8	15	24	35	48	63	80	99
$cl =$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Eine Erhöhung des Elektrolytgehalts der Lösung durch nichtdiffusible Anionen muß also die Aufnahme des diffusiblen Anions durch die Zelle fördern. Dieser Einfluß des nichtdiffusiblen Ions kann sich nicht nur in der Endverteilung der Ionen bei Gleichgewicht bemerkbar machen, sondern auch in der Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen in die Zelle zeigen, da diese durch die Erweiterung der Grenzen der etwaigen Anhäufung des Ions in der Zelle beschleunigt werden muß. Man kann demnach annehmen, daß die kolloidale Kieselsäure eine fördernde Wirkung in bezug auf die Aufnahme der diffusiblen Anionen durch die Zellen, unter anderem auch auf die des Anions der Phosphorsäuresalze, ausüben kann.

Die Wirkung des Kieselsäuresols auf die Anionendiffusion wurde zunächst in den Versuchen mit Kollodiummembranen geprüft.

Versuche mit Kollodiummembranen.

Das in diesen wie in den übrigen weiter unten beschriebenen Versuchen angewandte Kieselsäuresol wurde nach dem etwas modifizierten Verfahren *Kühns* bereitet; es enthielt ein wenig Natrium, und zwar im Verhältnis $Na_2O : 146\ SiO_2$.

Bei diesen Versuchen tauchten wir die je 10 ccm destilliertes Wasser enthaltenden Kollodiumhülsen in Bechergläser ein, die je 300 ccm einer m/3300 Rhodankaliumlösung enthielten[1]). In der einen Versuchsreihe wurde das Salz in Wasser, in der anderen in 5proz. Kieselsäuresol gelöst. Das p_H der Innenflüssigkeit wurde vor Versuchsbeginn dem p_H der Außenflüssigkeit durch Alkalizusatz gleichgemacht. Nach Ablauf bestimmter Zeiten wurde der Rhodangehalt der Flüssigkeit in den Hülsen kolorimetrisch ermittelt. Auf diese Weise haben wir folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle I.

Dauer des Versuchs in Stunden	Konzentration der CNS-Ionen in den Hülsen	
	ohne Kieselsäure	mit Kieselsäure
0,5	m/6000	m/3500
1	m/5000	m/2500
20	m/3500	m/1500

Aus den angeführten Angaben ist ersichtlich, daß die in der Lösung befindliche Kieselsäure die Anhäufung der diffusiblen Anionen im Innern der Hülse sowie auch die Geschwindigkeit ihres Hinüberwanderns auf die entgegengesetzte Seite der Membran in beträchtlichem Grade steigerte.

Um eine analoge Einwirkung von kolloidalen Kieselsäureionen auf die Aufnahme der Anionen von Phosphorsäuresalzen durch die Pflanzen festzustellen, wurden Vegetationsversuche mit Wasserkulturen von *Zea Mays* angestellt.

Versuche mit Wasserkulturen von Zea Mays.

Die Samen wurden auf Filtrierpapier keimen gelassen und die Keimlinge eine Woche auf fünffach verdünnter *Pfeffer*scher Nährlösung ohne Phosphorsäure gezüchtet. Um die Einwirkung von Kieselsäure auf die Aufnahme von Phosphorsäureanionen unabhängig von den übrigen Salzen der Nährlösung beobachten zu können, wandten wir eine fraktionierte Ernährung der Pflanzen an. Für die Kulturen wurden zwei Reihen von Vegetationsgefäßen benutzt, wobei jede Reihe aus fünf Gefäßen bestand.

[1]) Bei diesen Versuchen wurde das Rhodansalz deshalb gebraucht, weil sich der Rhodangehalt leicht kolorimetrisch mittels Farbreaktion mit Eisen ermitteln läßt.

In Reihe A enthielten alle Gefäße die *Pfeffer*sche Salznährlösung ohne Phosphorsäure, in Reihe *B* besaßen die Lösungen folgende Zusammensetzung:

im Gefäß 1 . . 0,03 g H_3PO_4 auf 1000 ccm 6proz. Kieselsäurelösung
„ „ 2 . . 0,03 g H_3PO_4 „ 1000 „ 1 „ „
„ „ 3 . . 0,03 g H_3PO_4 „ 1000 „ destillierten Wassers
„ „ 4 . . 1proz. Kieselsäurelösung
„ „ 5 . . destilliertes Wasser

Die Verteilung der Lösungen in den Vegetationsgefäßen ist aus dem folgenden Schema ersichtlich.

Nr. der Gefäße	1	2	3	4	5
Reihe A	*Pfeffer*sche Nährsalzlösung ohne P_2O_5				
Reihe B	Kieselsäure 6 Proz.	Kieselsäure 1 Proz.		Kieselsäure 1 Proz.	Wasser
	Phosphorsäure 0,03 g[1] auf 1000 ccm				

In Reihe A enthielten die Gefäße je 4 Liter Salzlösung (p_H 6,6), in Reihe B je 1 Liter (p_H 6,8). Am 17. Juli 1924 wurden die Pflanzen aus den verdünnten *Pfeffer*schen Nährlösungen in die Gefäße der Reihe B gebracht, wobei je vier Pflanzen auf jedes Gefäß kamen. Von Zeit zu Zeit wurden die Pflanzen aus den Gefäßen der Reihe B in diejenigen der Reihe A und umgekehrt versetzt. In den ersten verblieben die Pflanzen meist 1 Tag, in den letzteren 2 bis 3 Tage. Bei diesem Auswechseln wurden die Wurzeln jedesmal mit destilliertem Wasser abgespült. Die Lösungen wurden zweimal täglich durchgelüftet. Nach zwei- bis dreimaligem Auswechseln wurden die Lösungen der Reihe B durch Lösungen von gleicher Zusammensetzung erneuert; das p_H aller Flüssigkeiten wurde stets dem p_H der Lösung in Gefäß 1 durch Alkalizusatz gleichgemacht.

Bereits nach einigen Tagen blieb die Entwicklung der Pflanzen in den Gefäßen 4 und 5 (ohne P_2O_5) im Vergleich zu den übrigen merklich zurück, und auch weiterhin wies das Wachstum eine sehr schwache Zunahme auf, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Kieselsäure. Was die übrigen Gefäße anbetrifft, so gediehen die Pflanzen in denen mit Kieselsäure bedeutend besser als ohne diese; besonders die Pflanzen der Gefäße 1, die außer der Phosphorsäurelösung 6Proz. Kieselsäure enthielten, zeichneten sich durch stärkere Entwicklung der Stengel und Blätter und durch dunkleres Grün unter den übrigen aus.

Nach 7 Wochen wurden von den vier Pflanzen in jedem Gefäß je zwei zur Analyse genommen, wobei man die stärkste und die schwächste Pflanze auswählte, so daß die mittleren Exemplare in den Gefäßen blieben. Die Pflanzen wurden in frischem und lufttrockenem Zustande gewogen; darauf wurde ihr Gehalt an Phosphorsäure nach dem Verfahren von *A. N. Lebedjanzew* kolorimetrisch bestimmt. Die Resultate sind in der Tabelle II zusammengestellt.

[1] 6 Wochen nach Versuchsbeginn wurde der H_3PO_4-Gehalt dieser Lösungen bis auf 0,01 g pro Liter vermindert.

Tabelle II.

Nummer des Gefäßes	Pflanzengewicht			Gehalt an P_2O_5	
	frisch	lufttrocken			
			in bezug auf Gefäß 3		in Proz. der Trockensubstanz
	g	g		mg	
1	49	5,90	119,0	11,4	0,193
2	47	5,12	103,2	10,2	0,199
3	44	4,96	100	9,6	0,193
4	10,2	1,38	27,8	1,77	0,128
5	9,7	1,21	24,4	1,74	0,143

Aus den Versuchsergebnissen erweist sich eine direkte Abhängigkeit des Wachstums der Pflanzen von ihrem Gehalt an Phosphorsäure. Fehlte diese in der Nährlösung, so wuchsen die Pflanzen sehr schwach, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Kieselsäure. Wenn die Nährlösung kleine Mengen Phosphorsäure enthielt, gediehen die Pflanzen um so besser, je mehr Kieselsäure in der Lösung vorhanden war, wobei der relative (prozentuale) Gehalt der Pflanzen an Phosphorsäure unverändert blieb. Daraus ergibt sich, daß ein funktioneller Ersatz der Phosphorsäure durch die Kieselsäure in den Pflanzen nicht möglich ist, und daß die günstige Wirkung der Kieselsäure auf die Entwicklung der Pflanzen bei mangelhaftem Phosphorsäuregehalt der Nährlösung dadurch hervorgerufen wird, daß die erste die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Pflanzen fördert.

Während der weiteren Entwicklung zeigten die in den Gefäßen verbliebenen Pflanzen dasselbe Verhalten zu den Nährlösungen, wie es vorher beobachtet worden war. Das Wachstum der Pflanzen in den Gefäßen ohne Phosphorsäure kam bald fast völlig zum Stillstand, die Blätter begannen von unten abzusterben. Der Unterschied bei den übrigen Pflanzen in den Gefäßen mit und ohne Kieselsäure tritt bei ihrem weiteren Gedeihen noch schärfer in derselben Richtung wie früher hervor. Obgleich die Entwicklung der Pflanzen durch kaltes Wetter etwas verzögert wurde, gediehen sie doch in allen diesen Kulturen ziemlich gut und erreichten den Zustand der Blüte und der Kolbenbildung. Dabei traten diese Stadien in den verschiedenen Gefäßen nicht gleichzeitig ein, sondern in bestimmter Reihenfolge, angefangen in Gefäß 3 und beendet in Gefäß 1, mit Zwischenzeiträumen von etwa 4 bis 5 Tagen. Als die Versuche infolge kalten und trüben Wetters Anfang Oktober zum Abschluß gebracht wurden, befanden sich die Pflanzen im Zustande der Kolbenentwicklung, wobei die Kolben im Gefäß 1 gerade anfingen sich zu bilden, während sie im Gefäß 3 schon eine beträchtliche Entwicklung erreicht hatten. Somit wurde die Vegetationsperiode der Pflanzen in Gegenwart von Kieselsäure etwas verlängert.

Wie schon oben erwähnt und wie aus den in Tabelle II angeführten Ergebnissen ersichtlich ist, gediehen die Pflanzen in den Kulturen mit Phosphor- und Kieselsäure besser dort, wo eine verhältnismäßig größere Menge der letzteren (6 Proz.) vorhanden war. Später aber zeigten die Pflanzen in 6proz. Kieselsäurelösung einige Krankheitserscheinungen, die sich in einer gewissen Rötung der Blätter und im Eintrocknen ihrer Spitzen

und Säume äußerten, darauf begannen diese Pflanzen in ihrer Entwicklung im Vergleich mit denen in 1proz. Kieselsäurelösung zurückzubleiben, und bei Beendigung des Versuchs erwiesen sich die ersten etwas schwächer ausgebildet als die letzteren. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Ablagerung des Kieselsäuregels auf den Wurzeln der Pflanzen in der 6proz. Kieselsäurelösung. Diese in der letzten Periode der Pflanzenentwicklung beobachtete Ablagerung beschädigte das Wurzelsystem und hinderte die Aufnahme des Wassers und der Salze durch dasselbe. Das geht auch aus den weiter unten angegebenen Analysenresultaten hervor, die einen niedrigeren Phosphorsäuregehalt bei diesen Pflanzen als bei den übrigen aufweisen.

Die Kulturen wurden nach 11 Wochen beendet und die geernteten Pflanzen ebenso wie früher der Analyse unterzogen. Dabei wurde nicht nur der Gehalt der Pflanzen an Phosphorsäure, sondern auch der an Kieselsäure bestimmt. Die Resultate sind aus Tabelle III ersichtlich.

Tabelle III.

Nr. des Gefäßes	Pflanzengewicht			Gehalt an P_2O_5		Gehalt an SiO_2	
	frisch	lufttrocken					
	g	g	in bezug auf Gefäß 3	mg	in Proz. der Trockensubstanz	mg	in Proz. der Trockensubstanz
1	73,0	10,24	113,3	34,82	0,34	300	2,93
2	81,9	11,26	124,5	47,85	0,42	120	1,06
3	52,5	9,04	100	37,00	0,41	23	0,25
4	9,2	1,37	15,1	3,42	0,25	57	4,16
5	5,6	1,45	16,0	3,42	0,24	5,2	0,36

Abgesehen von der schon besprochenen Abweichung im Gefäß 1, die offenbar durch die oben erwähnten nebensächlichen und zufälligen Umstände hervorgerufen wurde, ergeben die Angaben dieser Tabelle dasselbe Bild wie die der Tabelle II. Die durch die Pflanzen aufgenommene Kieselsäure übte an und für sich gar keinen Einfluß auf die Entwicklung derselben aus. Für die Pflanzen war die Menge der aufgenommenen Phosphorsäure maßgebend, und die günstige Einwirkung der Kieselsäure machte sich nur insoweit geltend, als sie die Aufnahme der Phosphorsäure förderte.

Die fördernde Wirkung der Kieselsäure in bezug auf die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Wurzelzellen ließ sich auch durch die vergleichende Analyse der Phosphorsäurelösungen mit und ohne Kieselsäurezusatz feststellen, nachdem man die Weizenpflanzen mit ihren Wurzeln gewisse Zeit in diese Lösungen hatte eintauchen lassen.

Versuche über die Wirkung des Kieselsäuresols in bezug auf die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Wurzeln der jungen Weizenpflanzen.

Die aufgekeimten Weizenkörner wurden auf paraffinierte Netze, auf jedes 50 Körner, gebracht und die Netze mit den Keimlingen auf Bechergläser mit *Pfeffer*scher Nährlösung ohne Phosphorsäure gelegt. Nachdem das Wurzelsystem eine hinreichend starke Entwicklung während 2 bis 3 Wochen erreicht hatte, wurde die ursprüngliche Salzlösung durch Lösungen ersetzt, die teils nur Phosphorsäure allein, teils außer dieser noch Kiesel-

säuresol enthielten. Das p_H wurde vorläufig in allen Lösungen gleichgemacht. Die Bechergläser mit den Pflanzen wurden bei Zimmertemperatur von etwa 15° stehengelassen. Nach Ablauf eines gewissen Zeitraumes wurden die Pflanzen weggenommen und die unverbraucht gebliebene Phosphorsäure in den Lösungen kolorimetrisch bestimmt. Die Phosphorsäurebestimmungen wurden sowohl in den Versuchslösungen als auch in der ursprünglichen unter gleichen Bedingungen ausgeführt, wobei die in den Lösungen befindliche Kieselsäure vorläufig entfernt worden war. Bei diesen Versuchen wurden folgende Resultate erhalten:

Versuch 1.

P_2O_5-Gehalt	in ursprünglichen Lösungen		5,00 mg
	in Versuchslösungen nach 6 Stunden	ohne SiO_2	4,47 „
		0,75 Proz. SiO_2	3,62 „
		3,75 „ „	3,51 „

Versuch 2.

P_2O_5-Gehalt	in ursprünglichen Lösungen		3,25 mg
	in Versuchslösungen nach 3 Stunden	ohne SiO_2	2,22 „
		2,6 Proz. SiO_2	1,95 „

Bekanntlich hat *O. Lemmermann*[1]) in einer größeren Anzahl von Versuchen mit Sandkulturen nachgewiesen, daß die Kieselsäure die Wirkung der Phosphorsäure auf die Pflanzen wesentlich zu erhöhen vermag, namentlich dann, wenn diesen kolloidale Kieselsäure neben unzureichenden Mengen von Phosphorsäure dargeboten wird. Bei der Erklärung dieser Erscheinung hielt *Lemmermann* in seiner ersten Arbeit die Möglichkeit nicht für ausgeschlossen, daß die Phosphorsäure in den Pflanzen durch die Kieselsäure vertreten werden könnte. Später[2]) konnte er sich aber durch die Analyse der Pflanzen davon überzeugen, daß dies nicht der Fall ist, und er kam daher zu der gleichen Schlußfolgerung, die sich auch aus unseren Versuchen ergibt, nämlich, daß sich die Pflanzen nur ihrem Gehalt an Phosphorsäure gemäß unter den entsprechenden Versuchsbedingungen entwickelten, und daß die Kieselsäure gegebenenfalls insofern eine günstige Wirkung aufwies, als sie die Aufnahme der Phosphorsäure durch die Pflanze erhöhte. Für diese Erscheinungen sieht *Lemmermann* eine Erklärung in der Annahme einer lösenden Wirkung der Kieselsäure auf die Phosphate[3]), er bemerkt

[1]) *O. Lemmermann*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung 1922, T. A., S. 185; 1924, T. B, S. 185.

[2]) *O. Lemmermann* und *H. Wiessmann*, ebendaselbst 1925, T. A, S. 265.

[3]) Auf dieselbe Wirkung der Kieselsäure weist auch *Mitscherlich* hin, indem er versucht, eine Erklärung für die von *Lemmermann* beobachteten Erscheinungen zu finden. „Es ist dies wohl so zu denken“, schreibt er, „daß die lösliche Kieselsäure der Festlegung der Phosphorsäure entgegenwirkt, indem sie an Stelle der Phosphorsäure die entsprechenden Verbindungen eingeht. Nur so ist es erklärlich, daß die Kieselsäurewirkung bei Gegenwart geringer Phosphorsäuregaben stärker in Erscheinung tritt als bei stärkeren Phosphorsäuregaben.“ Georgine 1922, S. 517.

Fr. Duchoň versuchte die Befunde *Lemmermanns* über die günstige Wirkung der kolloidalen Kieselsäure dadurch zu erklären, daß sie die physikalisch ungünstigen Verhältnisse des Sandes verbessere. Vgl. *O. Lemmermann*, Zeitschrift für Pflanzenernährung und Düngung 1925, T. A. H. 5.

aber dabei selbst, daß die Natur der betreffenden Vorgänge dadurch nicht erschöpfend klargestellt wird. Die Wirkung der Kieselsäure in bezug auf die Aufnahme der Phosphorsäure mit dem Einfluß von Na-Salzen auf Aufnahme des K vergleicherd, schreibt *Lemmermann*:

„Wenn wir diesen Umstand zusammenhalten mit den oben angeführten Erwägungen, so scheint mir die von uns festgestellte Tatsache des Löslichwerdens von P_2O_5 durch SiO_2 nicht ausreichend zu sein, um hierdurch allein die erhöhte Aufnahme der P_2O_5 in befriedigender Weise zu erklären. Es scheint vielmehr, daß die SiO_2 die Einwanderung der P_2O_5 (bzw. das Na diejenige des K) noch auf eine andere Weise fördern kann. Daß dieser Vorgang sich innerhalb der Zellen abspielt, scheint, wie wir oben dargelegt haben, auf Grund unserer Untersuchungen nicht wahrscheinlich zu sein. Man muß also noch nach einer anderen Erklärungsmöglichkeit suchen . . . Die bisherigen in der Literatur vorliegenden Untersuchungen reichen aber vorläufig nicht aus, bestimmte Angaben nach dieser Richtung hin zu machen. Wir müssen uns daher zunächst an die Tatsache halten, daß die SiO_2 auf die Kalkphosphate lösend einwirken und dadurch die P_2O_5-Aufnahme und -Wirkung erhöhen kann, und der Zukunft die Entscheidung darüber überlassen, ob diese Eigenschaft der SiO_2 für ihre große ertragssteigernde Wirkung bei ungenügender P_2O_5-Ernährung der Pflanzen maßgebend ist“[1]).

Unsere Versuche mit den Kulturen in Wasserlösungen zeigen, daß die fördernde Einwirkung von Kieselsäure auf die Einwanderung der Phosphorsäure in die Pflanzenzellen auch dann zum Vorschein kommt, wenn der Einfluß der von *Lemmermann* vorausgesetzten lösenden Wirkung auf Phosphate ganz ausgeschlossen worden ist. Der Kieselsäureeffekt in diesem Falle wie auch der bei den *Lemmermann*schen Versuchen, insofern dieser nicht auf lösende Wirkung bezogen werden kann, läßt sich zwanglos als ein Ergebnis des unter den hier gegebenen Bedingungen zustande kommenden *Donnan*schen Membrangleichgewichts erläutern[2]). Zugunsten dieser Erläuterung sprechen auch die

---

[1]) *O. Lemmermann* und *H. Wiessmann*, l. c., S. 309 u. 310.

[2]) Durch das teilweise Eindringen der Kieselsäure in die Pflanzenzelle kann der betreffende Effekt des *Donnan*schen Membrangleichgewichts freilich nur bis zu einem gewissen Grade eingeschränkt, aber nicht ganz beseitigt werden. Die oben angeführten Tatsachen und Erwägungen legen die Vermutung nahe, daß die kolloidale Kieselsäure das Eindringen nicht nur der Phosphorsäure, sondern der diffusiblen Anionen überhaupt fördern müsse. Wenn das Anion, dessen Aufnahme die Kieselsäure befördert, als Nährstoff durch die Pflanze verwertet wird, so kommt ein entsprechender Zuwachs derselben zustande. Dieser Zuwachseffekt von der Kieselsäurewirkung muß offenbar im umgekehrten Verhältnis zum Bedarf der Pflanzenzellen an dem betreffenden Nährstoff stehen. Daraus ergibt sich, daß der Effekt in bezug auf NO_3-Ionen schwächer ausgeprägt werden müsse als der in bezug auf Phosphorsäureanionen, da die Phosphorsäure einen höheren Produktionswert als der Stickstoff besitzt. Durch diesen Umstand wurde vielleicht unter anderen das negative Ergebnis der Versuche *Lemmermanns* (l. c.) über die Kieselsäurewirkung in bezug auf Nitrate bedingt.

oben angegebenen Resultate der entsprechenden Versuche mit Kollodiummembranen.

Was die noch von *Hellriegel* und seinen Mitarbeitern[1]) und neuerdings von *Breaseale*[2]) beobachtete Erscheinung anbetrifft, daß die Aufnahme von K durch die Pflanze befördert wird, wenn der Lösung ein Na-Salz zugesetzt worden ist, so scheint eine derartige Einwirkung, abgesehen von etwaigen Veränderungen im Zustande der Plasmamembranen, auf verschiedenen Wegen zustande kommen zu können.

Wenn die für K-Ionen durchlässigen Zellmembranen für Na-Ionen undurchlässig sind — wie z. B. in einem Falle, den *J. Loeb*[3]) auf Funduluseiern bei einer bestimmten Zusammensetzung der Salzlösung beobachten konnte —, so können die letzteren in bezug auf die ersten als undialysable Ionen im Sinne des *Donnan*schen Membrangleichgewichts fungieren, ebenso wie die Anionen der kolloidalen Kieselsäure in bezug auf die der Phosphorsäure. Daraus ergibt sich eine Förderung des Eindringens von K-Ionen.

Dieselbe Wirkung kann ein Na-Salz auch dann hervorrufen, wenn die Zellmembranen für seine beiden Ionen permeabel sind, da die Konzentration der diffusiblen Anionen in der Lösung durch den Zusatz dieses Salzes gesteigert wird, was wiederum das Hinüberwandern diffusibler Kationen auf die entgegengesetzte Seite der Membran befördern kann. Diese fördernde Wirkung muß, wie schon oben erwähnt wurde, desto stärker in Erscheinung treten, je größer die Beweglichkeit der mit dem Na-Salz zugesetzten Anionen ist. Dabei können sich bis zu einem gewissen Grade auch sekundäre Einwirkungen geltend machen, die infolge des Wechsels zwischen den Zellen und der Außenlösung und der durch diesen Umtausch verursachten Veränderungen in der letzteren auftreten. Ist z. B. das Na der Lösung als Na-Nitrat zugesetzt worden, so kann sich deren Alkalität infolge einseitiger Aufnahme der Salpetersäure durch die Pflanzen steigern. Da aber die OH-Ionen eine größere Beweglichkeit besitzen, so müssen sie ihrerseits eine bedeutendere Einwirkung hinsichtlich des Eindringens von K-Ionen hervorbringen.

Bei der oben angegebenen Erläuterung der Ionenwechselwirkung sind etwaige Veränderungen im Plasmamembranzustande, die unter Einwirkung der Außenlösung auftreten können, nicht in Betracht gezogen worden. Durch diese Veränderungen kann das Verhalten

---

[1]) *Hellriegel*, *Willfart*, *Römer* und *Wimmer*, Arbeiten d. deutsch. landw. Ges. 1898, H. 34.

[2]) *Breaseale*, Journ. Agric. Research. 1924; zit. nach *Lemmermann*, l. c.

[3]) *J. Loeb*, Journ. of gener. Physiol. 5, 231, 1922; vgl. auch *E. Wertheimer*, Pflügers Arch. 200, 354, 1923.

der lebenden Zellen zu den in der Lösung befindlichen Salzen wesentlich komplizierter werden; auf diesem Gebiet sind aber unsere Kenntnisse zurzeit noch sehr beschränkt und unvollkommen.

Zusammenfassung.

Die mit dem *Donnan*schen Membrangleichgewicht verbundenen Erscheinungen müssen in den Pflanzenzellen weit verbreitet sein und eine wesentliche Rolle bei den osmotischen Verschiebungen und bei der Verteilung der diffusiblen Ionen spielen. Als undialysable Ionen können dabei nicht nur kolloidale Ionen im engeren Sinne des Wortes, sondern auch molekular gelöste Ionen fungieren, wenn die Plasmamembranen für diese undurchlässig sind.

Außer der dem *Donnan*schen Prinzip gemäß zustandekommenden Wirkung der nichtdiffusiblen Ionen können auch andere Einwirkungen für die Verteilung der Elektrolyte in den lebenden Zellen maßgebend sein, unter anderem die bei lebenden Membranen mögliche „irreziproke“ Permeabilität. Wenn diese Membranen tatsächlich eine irreziproke Permeabilität für die Ionen besitzen, so muß in die Gleichung des Membrangleichgewichts bei der Anwendung für lebende Zellen außer dem Produkt der Ionenkonzentrationen noch ein Permeabilitätsfaktor eingesetzt werden.

Das *Donnan*sche Membrangleichgewicht kann auch bei der Aufnahme der Salze durch das Wurzelsystem der Pflanzen eine gewisse Rolle spielen, wobei die Einwirkung von nichtdiffusiblen Ionen nicht nur von den Wurzelzellen ausgehen kann, sondern auch von der Außenlösung, wenn in ihr derartige Ionen vorhanden sind.

Es ist durch entsprechende Versuche mit Kollodiummembranen festgestellt worden, daß die in der Lösung befindliche Kieselsäure das Hinüberwandern der diffusiblen Anionen auf die entgegengesetzte Seite der Membran fördert.

In gleicher Weise wirkt die Kieselsäure auch in bezug auf die Aufnahme von Phosphorsäureanionen durch die Wurzelzellen der Pflanzen, wodurch sie einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung der Pflanzen bei relativem Phosphorsäuremangel in der Nährlösung ausübt.

Diese Erscheinungen treten in den angegebenen Fällen als Resultat des Zustandekommens des *Donnan*schen Membrangleichgewichts auf, wobei die kolloidalen Kieselsäureanionen als dialysierunfähige Ionen fungieren.

Aus den Ergebnissen unserer Versuche geht hervor, daß ein funktioneller Ersatz der Phosphorsäure durch die Kieselsäure in den Pflanzen nicht möglich ist.

Der von *Hellriegel* und neuerdings von *Breaseale* festgestellte fördernde Einfluß von Natriumsalzen in bezug auf die Aufnahme des Kaliums durch die Pflanzen scheint auf der durch den Zusatz jener Salze verursachten Konzentrationserhöhung der diffusiblen Anionen in der Nährlösung zu beruhen.

Wenn die für K-Ionen durchlässigen Zellmembranen für Na-Ionen undurchlässig sind, können Na-Salze das Eindringen der K-Ionen in die lebenden Zellen auch infolge des Zustandekommens des *Donnan*schen Membrangleichgewichts fördern.

Über eine neue Methode zur Trennung des Äthylalkohols von Acetaldehyd und Aceton.

Von

Günther Gorr und **Joachim Wagner.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 23. Mai 1925.)

Durch die Arbeiten von *C. Neuberg* und seinen Mitarbeitern ist aufgedeckt worden, daß dem Acetaldehyd als unmittelbarer Vorstufe des Äthylalkohols im pflanzlichen und tierischen Stoffwechsel eine große Bedeutung zukommt. Es ist daher wichtig, über ein brauchbares Trennungsverfahren für Äthylalkohol und Acetaldehyd sowie weiterhin auch für Weingeist und Aceton zu verfügen.

Die bisher angewendeten Methoden beruhen auf verschiedenen Prinzipien. Einerseits ist in älterer und neuerer Zeit die Acetaldehyd zerstörende Wirkung von Silberoxyd benutzt worden [vgl. die Angaben von *E. Friedmann*[1]), *N. Masuda*[2]), *G. Embden* und *K. Baldes*[3]) sowie von *C. Neuberg* und *J. Kerb*[4])]. Andererseits hat man die Reaktion zwischen Acetaldehyd und Natriumbisulfit[5]) heranzuziehen versucht in der Erwartung, von der an sich nicht flüchtigen Doppelverbindung den Äthylalkohol durch Destillation absondern zu können. Ferner wurden Trennungen von Weingeist und Acetaldehyd durch Behandlung mit *Fehling*scher Lösung vorgenommen[6]). Gute Dienste leistet auch das p-Nitrophenylhydrazin; es hält Aldehyde und Ketone als nicht flüchtige Kondensationsprodukte zurück und gestattet, den Alkohol

[1]) *E. Friedmann*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 211, 1908.
[2]) *N. Masuda*, diese Zeitschr. **45**, 142, 1912.
[3]) *G. Embden* und *K. Baldes*, ebendaselbst **45**, 161, 1912.
[4]) *C. Neuberg* und *J. Kerb*, ebendaselbst **53**, 414, 1913; **64**, 255, 1914.
[5]) *S. Kostytschew* und *E. Hübbenet*, H. **79**, 363, 1912; diese Zeitschr. **64**, 248, 1914. Vgl. hierzu *A. v. Lebedew* und *N. Griaznow*, B. **45**, 3263, 1912, sowie *C. Neuberg* und *J. Kerb*, l. c.
[6]) *A. v. Lebedew* und *N. Griaznow*, l. c.

durch Destillation davon zu scheiden[1]). Das bisher am meisten[2]) angewendete Silberoxydverfahren ist insofern mit Mängeln behaftet, als, ganz abgesehen von der Kostspieligkeit dieser Methode, außer dem Aldehyd nicht gering zu veranschlagende Mengen Alkohol zerstört werden[3]).

Es war somit geboten, nach anderen Möglichkeiten einer Acetaldehyd-Äthylalkohol-Trennung zu fahnden; wir versuchten, sie durch Benutzung von *Quecksilberoxyd* zu bewirken.

Durch die Arbeiten von *G. Denigès*, *C. Oppenheimer*, *E. Biilmann*, namentlich von *K. A. Hofmann*[4]), *S. M. Auld* und *A. Hantzsch*[5]) sowie von *J. U. Nef*[6]) sind eine Reihe von schwer löslichen und nicht flüchtigen Acetaldehyd-Quecksilber-Verbindungen, die Mercarbide, bekannt geworden. Somit schien es denkbar, durch Überführung des Acetaldehyds in solche Quecksilberoxydderivate das erstrebte Ziel einer Abtrennung von Acetaldehyd aus alkoholhaltigen Gemischen zu erreichen. Während Acetaldehyd bereits in neutraler oder ganz schwach alkalischer Lösung mit Quecksilberoxyd zur Bildung von Organo-Quecksilber-Verbindungen Anlaß gibt, wird Äthylalkohol nur in stark basischer Lösung, vermutlich soweit er hierbei zu Aldehyd oxydiert wird, vom Quecksilberoxyd angegriffen.

Tatsächlich gelingt es, auf diesem Wege die Trennung durchzuführen.

Wir sind so vorgegangen, daß die Äthylalkohol und Acetaldehyd enthaltenden Flüssigkeiten mit Quecksilberchlorid (3 bis 4 Mol.) und mit einer nicht äquivalenten Menge 1- bis 2 n Natronlauge in der Art versetzt wurden, daß ein 10proz. Unterschuß von Alkali gegenüber dem Quantum bestand, das theoretisch zur vollkommenen Umwandlung des Quecksilberchlorids in Quecksilberoxyd erforderlich gewesen wäre. Es zeigte sich, daß man dann durch etwa fünfstündiges Erhitzen am Energierückflußkühler den Acetaldehyd quantitativ entfernen kann, während der Weingeist nur zu einem geringen Prozentsatz (im Höchstfalle zu 4 bis 5 Proz.) in Mitleidenschaft gezogen wurde. Das steht durchaus im Einklange mit den Erfahrungen von *K. A. Hofmann* (l. c.), der nur konzentrierten Sprit in Gegenwart von freiem Ätzkali bei 1½tägigem Kochen durch Quecksilberoxyd zum Übergang

[1]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **89**, 398, 1918.

[2]) Über ein indirektes Vorgehen berichtet *K. Hoepner*, Chem. Centralbl. **1918**, I, 379.

[3]) Vgl. *Th. Curtius* und *H. Franzen*, A. **404**, 105, 1914.

[4]) *K. A. Hofmann*, B. **31**, 1904 und 2212, 1898.

[5]) *S. M. Auld* und *A. Hantzsch*, B. **38**, 2677, 1905; dort auch Nachweise der älteren Literatur.

[6]) *J. U. Nef*, A. **298**, 317, 1897.

in Mercabid befähigt fand. Die zerstörende Wirkung von Quecksilberoxyd auf den Acetaldehyd beruht allem Anscheine nach nicht allein auf einer Mercurierung, sondern wahrscheinlich wird ein Teil des Acetaldehyds direkt zu Essigsäure bzw. zu Trimercuri-essigsäure oxydiert, worauf aus dem Auftreten von freiem Quecksilber bei obiger Arbeitsweise wohl geschlossen werden darf.

Da auch *Aceton mit Quecksilberoxyd* ähnliche, nicht flüchtige mercurierte Verbindungen liefert[1]), kann auf dasselbe Verhalten ein Verfahren zur Trennung von Aceton und Äthylalkohol gegründet werden. Dabei geht man analog wie zur Acetaldehyd-entfernung vor. Hier gelang ebenfalls eine vollständige Beseitigung des Acetons ohne wesentliche Alkoholzerstörung. Demnach kommt dem *Quecksilberoxyd* offensichtlich eine Bedeutung als Mittel zur Trennung des Äthylalkohols vom Acetaldehyd sowie vom Aceton zu.

Die *praktische Ausführung* der vorgeschlagenen Methode gestaltet sich wie folgt:

Das Gemisch von Äthylalkohol und Acetaldehyd bzw. von Äthylalkohol und Aceton wird, nachdem der Gehalt an Carbonylverbindungen durch Titration ermittelt worden ist, mit frischem Quecksilberoxyd (auf 1 Mol. Aldehyd 3 bis 4 Mol. HgO), jedoch in Abwesenheit von Lauge, 4 bis 5 Stunden lang am Rückflußkühler auf dem Baboblech gekocht. Bei der nachfolgenden Destillation etwa mit übergegangenes Quecksilber[2]) läßt sich leicht durch einfache Filtration beseitigen. Der Alkoholgehalt dieser Lösung kann in bekannter Weise nach anreichernder Rektifikation durch pyknometrische Bestimmung ermittelt werden. Ist die Beimengung von Acetaldehyd oder Aceton sehr groß, so besteht die Möglichkeit, daß zunächst winzige Mengen der Carbonylkörper noch im alkoholischen Destillat vorhanden sind; unterwirft man letzteres abermals dem obigen Verfahren, so bringt man jedoch auch diese Spuren zu restlosem Verschwinden.

Um die *Leistungsfähigkeit der angegebenen Methode* zu prüfen, wurde eine Reihe von Versuchen mit wechselnden Mengen von Acetaldehyd, Aceton und Äthylalkohol vorgenommen.

Die Ergebnisse sind der Einfachheit halber in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Bei gewaltigem Überwiegen von Acetaldehyd (Verhältnis: 9 Teile Acetaldehyd auf 1 Teil Weingeist) war eine wiederholte Behandlung mit HgO notwendig, um allen Aldehyd zu beseitigen.

---

[1]) *K. A. Hofmann*, l. c.; *S. M. Auld* und *A. Hantzsch*, l. c.

[2]) Auch aus den Quecksilberverbindungen des Destillationsrückstandes kann man auf die übliche Art das Quecksilber bzw. Mercurioxyd wiedergewinnen.

Tabelle I.

Menge des Alkohols g	Menge des Acetaldehyds g	Menge des $HgCl_2$ g	Menge an NaOH ccm	Zeitdauer des Erhitzens Stunden	Proben auf Acetaldehyd im Destillat	Wiedergef. Menge Äthylalkohol g	Alkoholverlust Proz.
4,76	2,36	272	900 (2n)	5	negativ	4,55	4,40
4,36	4,33	136	900 (1n)	2	schw. positiv	4,21	3,44
3,96	3,93	272	900 (2n)	5	negativ	3,75	5,30
2,38	21,16	300	1000 (2n)	3	"	2,30	3,36

Tabelle II.

Menge des Alkohols g	Menge des Acetons*) g	Menge des $HgCl_2$ g	Menge an NaOH ccm	Zeitdauer des Erhitzens Stunden	Proben auf Aceton im Destillat	Wiedergef. Menge Äthylalkohol g	Alkoholverlust Proz.
4,56	4,58	136	900 (1n)	2	negativ	4,34	4,82
2,37	21,42	600	2000 (2n)	5	"	2,29	3,37
4,56	4,78	136	900 (1n)	3	"	4,42	3,07

*) Als Aceton wurde ein reines, aus der Bisulfitverbindung gewonnenes Material verwendet.

Es zeigt sich also, daß, wie zuvor ausgeführt worden ist, zur quantitativen Zurückhaltung des Acetaldehyds und Acetons Quecksilberoxyd in einer Menge anzuwenden ist, die etwa 4 Mol. entspricht, und daß außerdem auch die Zeitdauer des Erhitzens von Wichtigkeit ist, das der Sicherheit wegen auf 5 Stunden ausgedehnt wurde. Selbstverständlich kommt man bei kleineren Mengen von Acetaldehyd oder Aceton in kürzerer Zeit zum Ziele. Ferner fanden wir, daß auch unter den ungünstigsten Bedingungen [Verhältnis von Äthylalkohol zu Acetaldehyd (Aceton) wie 1 : 9] die Verluste an Weingeist nicht größer sind.

Über die Spaltbarkeit von Ätherschwefelsäuren der verschiedenen Reihen durch Sulfatase und über den Mechanismus der Sulfatasewirkung.

VII. Mitteilung über Sulfatase.

Von

Carl Neuberg und **Joachim Wagner.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Über das Ferment *Sulfatase*, das vor 2 Jahren von *C. Neuberg* und *K. Kurono* aufgefunden[1]) wurde, ist durch Untersuchungen des hiesigen Instituts bisher folgendes[2]) bekannt geworden: Die *pflanzliche Sulfatase*, die beispielsweise von Aspergillus oryzae hervorgebracht wird, hat sich als wirksam erwiesen gegenüber den Salzen der Phenolätherschwefelsäure, der p-Kresolschwefelsäure[3]) und β-Naphtholschwefelsäure[4]). Die Sulfatase spaltet die genannten ätherschwefelsauren Salze sowohl in rein wässeriger Lösung als im natürlichen Milieu, wie es im Harn vorliegt[5]). Da bei der enzymatischen Zerlegung gemäß der Gleichung

$$R.OSO_3K + H_2O = R.OH + KHSO_4$$

Kaliumbisulfat, also in wässeriger Lösung freie Schwefelsäure, auftritt, so ist es notwendig, ein Neutralisationsmittel anzuwenden, das sofort die entstehende Schwefelsäure bindet und eine unspezifische Säurehydrolyse der Ätherschwefelsäuren verhindert. Das gelingt leicht durch Zusatz von kohlensaurem Kalk oder dergleichen. Bei allen diesen Fermentversuchen ist durch Beigabe von Toluol die notwendige Sterilität gesichert worden.

Bemerkenswerterweise findet sich nun die *Sulfatase auch im animalischen Organismus*[6]). Ihr Vorkommen an dieser Stelle ist um so beachtenswerter, als ja im Tierkörper die Bildung der typischen

[1]) *C. Neuberg* und *K. Kurono*, diese Zeitschr. **140**, 295, 1923.
[2]) Siehe *C. Neuberg*, Die Naturwissenschaften **12**, 797, 1924.
[3]) *C. Neuberg* und *K. Linhardt*, ebendaselbst **142**, 191, 1923.
[4]) *I. Noguchi*, ebendaselbst **144**, 138, 1924.
[5]) *Derselbe*, ebendaselbst **143**, 186, 1923.
[6]) *C. Neuberg* und *E. Simon*, ebendaselbst **156**, 365, 1925.

Ätherschwefelsäuren als eine Funktion des Stoffwechsels erfolgt. Die Organe von Tieren (Kaninchen und Meerschweinchen) wie von Menschen[1]) hydrolysieren die phenolätherschwefelsauren Salze. Auch Trockenpräparate, die durch einfache Entwässerung der Gewebe oder durch Behandlung mit Aceton gewonnen worden sind, spalten die ätherschwefelsauren Salze, und ebenso verhalten sich die wässerigen Auszüge tierischer Zellen.

Aus den vorliegenden Feststellungen ergibt sich, daß die ätherschwefelsauren Salze der einfachen Phenole (Phenol, p-Kresol sowie β-Naphthol) enzymatisch von der Sulfatase zerlegt werden. Es war nun für die Kennzeichnung der Sulfatase eine wichtige *Aufgabe, zu untersuchen, welche Ätherschwefelsäuren überhaupt spaltbar* sind. Es wäre denkbar gewesen, daß die Wirkung des Ferments sich nur auf die in der Natur vorkommenden Äthersulfate erstreckt hätte. Das ist jedoch nicht der Fall. Es hat sich nämlich zunächst gezeigt, daß die einfachen Substitutionsprodukte des Phenols, die *m-Chlorphenol-, p-Chlorphenol- und p-Bromphenol-ätherschwefelsäure,* durch die Pilzsulfatase angegriffen werden. Auch die Nitrophenole, und zwar die drei isomeren *o-, m- und p-Nitrophenole,* werden aus den entsprechenden Äthersulfaten, die synthetisch zugänglich sind, durch die Sulfatase in Freiheit gesetzt. Von komplizierter gebauten Phenolderivaten wurden das *carvacrol-schwefelsaure Kalium* sowie das *vanillin-schwefelsaure Kalium* untersucht und spaltbar befunden.

Alle diese genannten neuen Verbindungen sind Derivate von Monophenolen. Während die Hydrolyse des carvacrol-schwefelsauren und vanillin-schwefelsauren Kaliums nur unvollständig blieb (7 bzw. 40 Proz.), wurden die übrigen Verbindungen *zu 70 bis 100 Proz.* durch das Enzym zerlegt.

Von den mehrwertigen Phenolderivaten wurde die *Hydrochinon-monoschwefelsäure,* die bekanntlich auch in der Natur, und zwar im Pferdeharn, auftritt, von der Sulfatase angegriffen. Als ein weiterer Benzolabkömmling wurde das *Äthersulfat der p-Oxybenzoesäure* in Form des neutralen Dikaliumsalzes geprüft; hier wurde eine Hydrolyse bis zu 68 Proz. erreicht.

Die erwähnten Verbindungen gehören der Benzolreihe an. Es ist nun bekannt, daß nach Einverleibung in den tierischen Organismus Substanzen der heterozyklischen Reihen gleichfalls als Ätherschwefelsäuren zur Ausscheidung gelangen, beispielsweise Derivate des Chinolins und Indols. Daher wurden auch solche Körper in den Kreis der Untersuchungen gezogen. Als Typen wurden verwendet die Kaliumsalze der *o-Oxychinolin-schwefelsäure* und der *Indoxyl-schwefelsäure*;

[1]) *L. Rosenfeld,* diese Zeitschr. 157, 434, 1925.

namentlich die letztgenannte Verbindung beansprucht ein bedeutendes Interesse, da sie neben der Indoxyl-glucuronsäure die Muttersubstanz des Indigo liefernden Harnbestandteils darstellt. Eine Angabe, die sich über die Indoxyl-schwefelsäure in der Literatur vorfindet, ist zu berichtigen. Ihre frühere, von *E. Baumann*[1]) beschriebene bedeutende Zersetzlichkeit ist nicht einmal ihren Lösungen eigen, sobald die Verbindung wirklich rein ist. Sie wurde nach der vortrefflichen Vorschrift von *A. Jolles* und *E. Schwenk*[2]) aus synthetischem N-Acet-indoxyl bereitet. Offenbar ist es ein geringer Gehalt an Eisen oder ein solcher an einem anderen Katalysator[3]), der die ehemals angenommene Zersetzlichkeit bedingt. Lösungen von wirklich reinem indoxyl-schwefelsauren Kalium konnten 1 Monat im Brutschrank bei 37° belassen werden, ohne daß die geringste Spur von Indoxyl bzw. Indigo oder freier Schwefelsäure auftrat. In festem Zustande konnte das Salz in einer braunen Flasche 4 Monate unverändert aufbewahrt werden; ob noch länger, wurde nicht festgestellt, da der Vorrat gleicher Fertigung nach dieser Zeit verbraucht war.

Das indoxyl-schwefelsaure Kalium ist ebenfalls gut durch Sulfatase zerlegbar, zu etwa 68 Proz. innerhalb einer Zeit von 21 Tagen. Die Spaltbarkeit bleibt aber zurück hinter der der Nitro- und Halogenphenole. Auffallenderweise wurde sogar das Äthersulfat des o-Oxychinolins besser enzymatisch hydrolysiert.

Somit zeigt sich, daß die ätherschwefelsauren Salze von einfachen Phenolen und Naphtholen, von Dioxybenzolen, substituierten Phenolen, Phenolaldehyden sowie von Phenolcarbonsäuren durch die Sulfatase zerlegt werden. Die Ätherschwefelsäuren stickstoffhaltiger Ringsysteme, die des Chinolins und des Indols, werden gleichfalls gespalten.

An dieser Stelle sei bemerkt, daß die verwendeten Substanzen sämtlich synthetisch bereitet wurden. Wir verfügen über zwei Methoden zur Darstellung von phenolätherschwefelsauren Salzen, erstens über das alte Verfahren von *E. Baumann*[4]), das in der Einwirkung von Kaliumpyrosulfat auf die alkalische Lösung der Phenole besteht, und zweitens über das Verfahren von *Verley-Czapek*[5]), bei dem mit Chlorsulfonsäure in Pyridinlösung gearbeitet wird. Die letztgenannte Methode ist im allgemeinen ergiebiger. Sie gelangte stets zur Anwendung bis auf die Fälle der Hydrochinon-mono-schwefelsäure und der

---

[1]) *E. Baumann*, H. **1**, 60, 1877; Pflügers Arch. **13**, 285, 1876.

[2]) *E. Schwenk* und *A. Jolles*, diese Zeitschr. **68**, 347, 1915; **69**, 467, 1915.

[3]) *C. Neuberg* und *E. Schwenk*, ebendaselbst **71**, 219, 1915.

[4]) *E. Baumann*, B. **11**, 1907, 1878.

[5]) *A. Verley*, Bull. Soc. Chim. Paris [3] **25**, 49, 1901; *E. Czapek*, Monatshefte f. Chem. **35**, 635, 1914.

p-Oxybenzoesäure-schwefelsäure. Unter den genannten Verbindungen wurden neu dargestellt die ätherschwefelsauren Kaliumsalze des o-, m- und p-Nitrophenols, des m- und p-Chlorphenols und des p-Bromphenols.

Wie man sieht, gehören alle die aufgezählten, durch die Sulfatase spaltbaren Verbindungen zum System des Benzols oder zu den ihm ähnlichen Ringtypen des Naphthols, Chinolins und Indols, also zu Substanzen, die mindestens einen aromatischen Kern enthalten und bei denen der Schwefelsäure—rest esterartig an einem phenolischen Hydroxyl haftet.

Um nun über den Wirkungsbereich der Sulfatase weitere Aufschlüsse zu erlangen, wurden die Äthersulfate anderer alkoholischer Gebilde untersucht. Zunächst wurden das einfache *äthylschwefelsaure Kalium* und das *amylschwefelsaure Natrium* geprüft. Diese beiden aliphatischen Substanzen wurden nach den bisherigen Ergebnissen nicht als spaltbar befunden. Das gleiche negative Ergebnis zeigte sich bei den hydroaromatischen Verbindungen, die ja in ihrem Charakter den Körpern der Fettreihe näher stehen als den Benzolabkömmlingen. Nicht gespalten wurden *m-methyl-cyclohexanol-schwefelsaures Kalium*, welches erstmalig nach der Chlorsulfonsäure-methode dargestellt wurde, sowie *d- und l-borneol-schwefelsaures Kalium*. Ganz dieser Regel gemäß ist auch das *Äthersulfat der Mandelsäure* nicht spaltbar; denn hier ist die Schwefelsäure als Ester an die aliphatische Seitenkette geknüpft.

Somit ist nicht die zyklische Struktur entscheidend für die Spaltbarkeit einer Verbindung durch Sulfatase, sondern es hat nach den bisherigen Erfahrungen den Anschein, daß ein *Hydroxyl von aromatischem Charakter* mit Schwefelsäure verestert sein muß, damit das Äthersulfat dem Angriff durch das Enzym Sulfatase zugänglich ist. In diesem Umstande kann man eine gewisse Analogie zum physiologischen Verhalten erkennen. Phenol, Indoxyl sowie o-Oxychinolin[1]) werden im Tierkörper hauptsächlich mit Schwefelsäure gepaart, während die hydroaromatischen und aliphatischen Substanzen vorwiegend durch Bindung an Glucuronsäure entgiftet werden. Ganz scharf ist diese Trennung alllerdings nicht, indem Phenol und Indoxyl sich auf beide entgiftende Säuren, auf Schwefelsäure und auf Glucuronsäure, verteilen, wobei freilich die Paarung mit Schwefelsäure häufig überwiegt. Es darf in diesem Zusammenhange auf die Beziehung hingewiesen werden, die auch rein äußerlich darin besteht, daß nach Erfahrungen von *A. Kossel*[2]), *C. Neuberg* und *E. Kretschmer*[3]) sowie *C. Neuberg* und *E. Schwenk*[4]) schön kristallisierte

[1]) *C. Brahm*, H. **28**, 439, 1899.
[2]) *A. Kossel*, H. **7**, 292, 1883.
[3]) *C. Neuberg* und *E. Kretschmer*, diese Zeitschr. **36**, 15, 1911.
[4]) *C. Neuberg* und *E. Schwenk*, ebendaselbst **79**, 383, 1917.

Doppelverbindungen von gepaarten Ätherschwefelsäuren und gepaarten Glucuronsäuren isoliert werden können.

Weitere Untersuchungen betreffen sodann den *Mechanismus der Sulfatasewirkung*. Bereits vorher ist erwähnt worden, daß wegen der autokatalytischen Wirkung des in Freiheit gesetzten Bisulfats ein Zusatz neutralisierender Agenzien bei den Fermentversuchen erforderlich ist. Außer dem schon genannten Neutralisationsmittel, dem kohlensauren Kalk, wurde auch Bariumcarbonat geprüft. Trotz der sich öfter geltend machenden giftigen Wirkung des Barium-ions wurde im vorliegenden Falle keine Beeinträchtigung konstatiert, indem die Spaltung beispielsweise beim phenol-schwefelsauren Kalium in Gegenwart von kohlensaurem Barium und kohlensaurem Calcium ungefähr gleich weit fortschritt.

Mit dem indoxyl-schwefelsauren Kalium wurden *vergleichende Versuche* angestellt *über die Wirkung verschiedener Sulfatasemengen*. Sie lehrten, wie zu erwarten stand, daß mit steigender Fermentmenge die Hydrolyse zunimmt. Bei den Ansätzen mit indoxyl-schwefelsaurem Kalium trat besonders die Notwendigkeit zutage, als neutralisierende Bodenkörper ein reines Erdalkalicarbonat zu benutzen; denn jene an sich (s. S. 494) recht beständige Substanz geht schnell zugrunde, wenn freie Säure oder Schwermetallsalze in der Lösung zugegen sind. Versuche, die Neutralisationsmittel Calciumcarbonat oder Bariumcarbonat durch Puffergemische, z. B. Natriumacetat-Essigsäure oder Dinatriumphosphat oder ein Gemisch von 1 Mol. Mononatriumphosphat + 2 Mol. Dinatriumphosphat, zu ersetzen, lehrten, daß hierdurch nichts gewonnen wird, sondern daß sich die als Bodenkörper angewendeten Erdalkalicarbonate am günstigsten verhielten.

Durch die Heranziehung des Bariumcarbonats dürfte das Gleichgewicht der fermentativen Hydrolyse verschoben werden, indem die in Freiheit gesetzten Sulfat-ionen entfernt werden. Beim Calciumcarbonat war der gleiche Effekt nachweisbar, man konnte ihn jedoch nur in schwächerem Maße erwarten gemäß der größeren Löslichkeit des Gipses.

Daß man tatsächlich die Reaktion zu beeinflussen vermag durch Zusatz eines Mittels, das eines der Spaltungsprodukte entfernt, zeigten *Versuche über die fermentative Zerlegung von phenol-ätherschwefelsaurem Kalium unter Beigabe von sehr viel Toluol* (Zufügung von Toluol in einer Quantität von drei Vierteln des angewendeten Flüssigkeitsvolumens). Da Toluol ein gutes Solvens für das abgespaltene Phenol bildet, schreitet die enzymatische Hydrolyse weiter fort als ohne große Toluolmengen (s. S. 504).

Schließlich wurde noch *festgestellt, daß es sich bei der Pilz-sulfatase so wenig wie bei der tierischen Sulfatase um ein Enzym handelt, das an*

feste Zellbestandteile gebunden ist; denn eine mit Wasser mazerierte Lösung des Ferments lieferte durch vollkommen klare Filtration eine Flüssigkeit, in der die Sulfatase in kaum vermindertem Maße wirksam war.

Versuchsergebnisse.

Die zu den folgenden Versuchen verwendeten ätherschwefelsauren Salze wurden, wie schon im allgemeinen Teil angeführt wurde, meistens nach dem Verfahren von *Verley-Czapek* bzw. von *Schwenk* und *Jolles* bereitet.

Nach dieser Methode bringt man die hydroxylhaltige Substanz, in Pyridin und Chloroform gelöst, mit Chlorsulfonsäure zusammen. Nach Verjagen der Lösungsmittel wird mit Kalilauge versetzt und das entstandene ätherschwefelsaure Kalium nach erneutem Einengen mit Alkohol extrahiert. Die Reinigung der noch chlor- und sulfathaltigen Substanzen geschah durch Umkristallisation aus sehr wenig Wasser, wodurch man in kurzer Zeit ein einwandfreies Salz erhalten konnte; die von *Czapek* empfohlene Methode der Kristallisation aus Alkohol bewährte sich nicht so gut, da sie zwecks Gewinnung völlig reiner Produkte sehr oft hintereinander angewendet werden mußte und deshalb beträchtliche Verluste mit sich brachte. Dieses Darstellungsverfahren erwies sich als weniger brauchbar bei der Bereitung vom Monoschwefelsäureester des Hydrochinons sowie vom Äthersulfat der p-Oxybenzoesäure; deshalb wurde in diesen Fällen die alte Methode von *E. Baumann* benutzt. Auch nach diesem Verfahren gelangten wir zu völlig reinen Substanzen.

Nach jeder Neudarstellung eines ätherschwefelsauren Salzes wurde durch genaue Analyse die Reinheit der gewonnenen Substanzen geprüft; außerdem verschafften wir uns vor Ansatz jedes neuen Versuchs darüber Gewißheit, ob durch die Aufbewahrung auch keine Zersetzung eingetreten war.

Die ätherschwefelsauren Salze wurden ausnahmslos in 1 proz. wässerigen Lösungen der Einwirkung des Enzyms ausgesetzt. Zur Wahrung der Sterilität wurde stets 1 Proz. Toluol und zur Neutralisation der abgespaltenen Schwefelsäure in den meisten Fällen gefälltes reines Calciumcarbonat in einer Menge von 4 Proz. vom Gewichte der Flüssigkeit hinzugegeben.

Die Versuche wurden durchweg bei einer Temperatur von 35 bis 37° vorgenommen.

Zusammen mit den eigentlichen Fermentversuchen wurde immer ein Teil der Salzlösung ohne Ferment unter sonst gleichen Bedingungen (Zugabe von Erdalkalicarbonat und dergleichen mehr) als Kontrolle aufbewahrt. Es zeigte sich, daß die Mehrzahl der verwendeten ätherschwefelsauren Salze, wenn sie ursprünglich wirklich rein gewesen sind, auch in wässeriger Lösung sehr beständig ist, sich während der Dauer der Versuche überhaupt nicht, oft sogar in Monaten sich nicht zersetzt.

Zur Methodik der Schwefelsäure-analysen sei noch folgendes bemerkt:

Nach dem Vorgehen von *Neuberg* und Mitarbeitern wurde in allen Fällen die vom Ferment unzersetzt gelassene Menge Ätherschwefelsäure bestimmt, nachdem die wegen der Löslichkeit des Calciumsulfats zum Teil noch in Lösung befindliche, abgespaltene Schwefelsäure und störende Substanzen aus dem Fermentmaterial (Phosphate usw.) durch Fällung mit alkalischer Bariumsalzlösung (1 Teil Bariumchloridlösung und 2 Teile Barytwasser) entfernt worden waren. Das alkalische Filtrat wird mit Salzsäure stark angesäuert und längere Zeit in lebhaftem Sieden gehalten. Es fällt zumeist grob kristallinisches Bariumsulfat aus, das leicht filtriert und zur Wägung gebracht werden kann.

Unmittelbar nach Ansatz eines jeden Versuchs wurden für eine Anfangsbestimmung des vorhandenen Schwefelsäuregehalts 10,0 ccm der Flüssigkeit entnommen, in der oben beschriebenen Weise mit 15,0 ccm alkalischer Chlorbariumlösung im Meßkolben vermischt und mit Wasser auf 50,0 ccm aufgefüllt. Nach dem Filtrieren wurden vom alkalischen Filtrat 35,0 ccm, die also 7,0 ccm Urlösung entsprachen, zur Analyse verwendet. Ganz analog verfuhren wir auch bei allen weiteren Analysen.

Als Fermentmaterial wurde ein aus dem Schimmelpilz Aspergillus oryzae stammendes Trockenpräparat, welches unter dem Namen Takadiastase in Japan und England im Handel ist, angewendet. Diese Takadiastase enthält neben vielen anderen Enzymen auch die Sulfatase in beträchtlicher Menge. Daß der Gehalt an Sulfatase jedoch keineswegs ein konstanter ist, zeigte sich schon bei verschiedenen Proben des japanischen Fermentmaterials, ganz besonders deutlich aber durch den *Vergleich des japanischen Ferments mit einer aus England bezogenen Takadiastase.*

Deshalb sei als erster der angestellten Versuche folgender beschrieben, der diese Unterschiede gut erkennen läßt.

Es wurden nach den oben erläuterten Prinzipien verwendet:

A.	Phenolsalz	0,2 g
	Wasser	20,0 ccm
	Toluol	0,2 g
	$CaCO_3$	0,8 g
	Englisches Ferment	0,1 g.
B.	Phenolsalz	0,2 g
	Wasser	20,0 ccm
	Toluol	0,2 „
	$CaCO_3$	0,8 g
	Japanisches Ferment	0,1 g.

Dazu kamen die entsprechenden Kontrollen, welche die einzelnen Ingredienzien ohne Enzym enthielten. Nach 2 Tagen zeigte sich eine Spaltung

beim englischen Ferment zu 2,31 Proz.,
„ japanischen „ „ 10,75 „ .

Sodann sind eingehend als Substitutionsprodukte des Phenols die *Äthersulfate des m- und p-Chlorphenols, p-Bromphenols sowie der drei isomeren Nitrophenole* untersucht worden. Die ätherschwefelsauren Kaliumsalze aller dieser Substanzen wurden in sehr guten Ausbeuten nach der Chlorsulfonsäure-methode bereitet; dabei kristallisierten die Salze der Chlorphenole und des Bromphenols sowie die des m-Nitrophenols in Analogie zu dem einfachen phenolschwefelsauren Kalium in prachtvollen, perlmutterartig glänzenden Blättchen, während die Salze des o- und p-Nitrophenols in nadelförmigen Kristallen erhalten wurden. Sämtliche Salze sind in Wasser leicht löslich, schwerer dagegen in Alkohol, praktisch gar nicht löslich in Äther sowie in anderen organischen Solvenzien. Die Salze waren lange Zeit haltbar mit Ausnahme des o-nitrophenol-schwefelsauren Kaliums, bei dem eine größere Neigung zur Zersetzung im festen Zustande auffiel als bei seinen Isomeren. Auch der Hydrolyse durch Sulfatase scheint es leichter zugänglich zu sein.

Die Salze wurden in der zuvor beschriebenen Weise in 1 proz. Lösung unter Zugabe von Calciumcarbonat und Toluol der Einwirkung des Fermentmaterials unterworfen.

Die Ergebnisse der schwefelsäure-abspaltenden Wirkung sind der Einfachheit wegen in den Tabellen I und II zusammengefaßt.

Die von sämtlichen Salzen angefertigten Kontrollösungen zeigten nach den angegebenen Zeiten keine Spur einer Zersetzung.

Tabelle I.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
m-Chlorphenolsalz 100	1,5	0	0,0750	—
		1	0,0558	25,60
		3	0,0400	46,67
		7	0,0267	64,40
		11	0,0154	79,47
p-Chlorphenolsalz 100	1,5	0	0,0724	—
		1	0,0514	28,00
		3	0,0411	43,23
		7	0,0300	58,57
		11	0,0209	71,13
p-Bromphenolsalz 100	1,5	0	0,0820	—
		1	0,0622	24,15
		3	0,0491	40,12
		7	0,0373	54,51
		11	0,0216	73,67

Tabelle II.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
o-Nitrophenolsalz 100	1,5	0	0,0816	—
		1	0,0522	32,35
		3	0,0311	61,89
		7	0,0095	88,36
		13	0,0000	100,00
m-Nitrophenolsalz 100	1,5	0	0,0816	—
		1	0,0562	31,13
		3	0,0375	54,05
		7	0,0177	78,31
		13	0,0059	92,77
p-Nitrophenolsalz 100	1,5	0	0,0816	—
		1	0,0582	28,68
		3	0,0327	59,93
		7	0,0126	84,56
		13	0,0000	100,00

Sobald die enzymatische Hydrolyse bei den drei nitrophenolschwefelsauren Salzen angenähert 100 Proz. erreicht hatte, wurde der Versuch ausgeführt, *aus den Reaktionsflüssigkeiten die abgespaltenen Nitrophenole zu gewinnen.*

Zu diesem Zwecke wurden die Ansätze zunächst filtriert, die Filter so lange mit heißem Wasser ausgewaschen, bis das Wasser völlig farblos abfloß; darauf wurden die Filtrate schwach mit Phosphorsäure angesäuert und sofort mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Die mit geglühtem Natriumsulfat sorgfältig getrockneten ätherischen Auszüge wurden alsdann durch langsames Abdunsten auf dem Wasserbade eingeengt und die im Kolben zurückgebliebenen Mengen Nitrophenol zur Wägung gebracht, nachdem vorher das Gewicht des leeren Kolbens ermittelt worden war. Die gefundenen Quantitäten stimmten recht gut mit den aus den Schwefelsäureanalysen errechneten Werten überein. Die drei Nitrophenole konnten durch die schon nach einmaliger Umkristallisation richtigen Schmelzpunkte identifiziert werden.

Daß es sich nicht etwa um unverändert zurückgewonnene ätherschwefelsaure Salze handelte, konnte, abgesehen von deren Unlöslichkeit in Äther, auch dadurch bewiesen werden, daß die zurückerhaltenen Substanzen nach Lösung in Wasser absolut keine Schwefelsäurereaktion beim Kochen mit salzsaurer Bariumchloridlösung ergaben. Gemäß der nicht bis ganz zum Ende fortgeschrittenen Hydrolyse beim m-Nitrophenol spaltete hier die ausgeätherte *wässerige* Flüssigkeit nach Behandlung mit alkalischer Chlorbariumlösung, Filtration und Kochen mit Salzsäure noch schwach Schwefelsäure ab; sie rührte von dem

enzymatisch nicht zerlegten Rest an m-nitrophenol-schwefelsaurem Salz her.

In analoger Weise wurden auch die *ätherschwefelsauren Salze des Carvacrols und des Vanillins* untersucht. Beide Salze waren nach der Chlorsulfonsäure-methode dargestellt, und zwar nach dieser das carvacrol-schwefelsaure Kalium zum erstenmal. Die Ausbeuten waren besonders beim Carvacrol sehr gut. Das Carvacrolsalz schied sich in weißen, nadelförmigen Kristallen ab. Die von *B. Heymann* und *W. Königs*[1]) beobachtete leichte Zersetzlichkeit des Salzes konnte nicht bestätigt werden; vielmehr war eine Probe ein halbes Jahr ohne die geringste Zersetzung haltbar. Das vanillin-schwefelsaure Salz wurde in Übereinstimmung mit *Verley* in gelblichen, leicht in Wasser löslichen Nadeln erhalten.

Während unter den gleichen Versuchsbedingungen das carvacrol-schwefelsaure Kalium nur wenig hydrolysiert wurde, zeigte sich beim Vanillinsalz eine recht weitgehende enzymatische Spaltbarkeit. In den Kontrollansätzen war nach den angegebenen Zeiten keinerlei Zerlegung zu erkennen.

Die Ergebnisse waren folgende (s. Tabelle III):

Tabelle III.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
Carvacrolsalz 100	1,5	0	0,0723	—
		1	0,0712	1,52
		4	0,0686	5,12
		7	0,0673	6,92
Vanillinsalz 100	1,5	0	0,0437	—
		1	0,0313	28,28
		2	0,0272	37,76
		5	0,0264	39,59

Als Abkömmling eines zweiwertigen Phenols wurde das *hydrochinon-mono-schwefelsaure Kalium* und als Derivat einer Benzolcarbonsäure das neutrale Dikaliumsalz der *p-Oxybenzoesäure-schwefelsäure* der Einwirkung der Sulfatase ausgesetzt (s. Tabelle IV). Wieder erwiesen sich die Kontrollösungen als resistent.

In ihrem Verhalten gegenüber der Sulfatase schlossen sich den bisher besprochenen einfachen Benzolabkömmlingen die Kaliumsalze der *Indoxyl-schwefelsäure* sowie der *o-Oxychinolin-schwefelsäure* an, die beide nach den Vorschriften von *Jolles* und *Schwenk* bzw. von

[1]) *B. Heymann* und *W. Königs*, B. 19, 3309, 1886.

Tabelle IV.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
Hydrochinonmonosalz	1,5	0	0,0677	—
100		2	0,0524	22,60
		4	0,0508	24,97
		9	0,0477	29,54
		21	0,0467	31,02
p-Oxybenzoesäuresalz	1,5	0	0,0393	—
100		1	0,0243	36,64
		4	0,0154	59,03
		10	0,0113	68,71

Czapek dargestellt werden konnten. Im Falle des indoxyl-schwefelsauren Kaliums vermochte man die enzymatische Zerlegung sogar deutlich mit dem Auge zu verfolgen, da nämlich der als Spaltungsprodukt auftretende Indigo der Lösung schon nach ½stündigem Stehen im Brutschrank einen grünlichen Farbton verleiht. Nach längerer Zeit fällt dann der Farbstoff in dichten blauen Flocken aus und erteilt zugleich der Toluolschicht eine rotstichige Färbung. Der abgeschiedene Indigo stört die Schwefelsäurebestimmung in keiner Weise, da er beim Verglühen unter den üblichen Kautelen sich verflüchtigt.

Die Tabelle V möge die bei diesen Substanzen gewonnenen Ergebnisse darstellen. Eine Verringerung des zugegebenen Fermentmaterials auf etwa den achten Teil der sonst angewendeten Menge

Tabelle V.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
Indicansalz	1,5	0	0,0572	—
100		1	0,0377	34,09
		3	0,0312	45,46
		5	0,0272	52,45
		9	0,0243	57,52
		21	0,0182	68,19
Indicansalz	0,2	0	0,0629	—
100		1	0,0598	4,93
		3	0,0586	6,84
		7	0,0572	9,06
		11	0,0570	9,22
o-Oxychinolinsalz	1,5	0	0,0829	—
100		1	0,0577	30,40
		3	0,0410	50,54
		7	0,0226	72,74
		11	0,0114	86,25

hatte eine entsprechende Verminderung der Spaltung zur Folge. Die Kontrolle beim indoxylschwefelsauren Kalium zeigte in diesem Falle gerade nach einem Monat Erscheinungen der beginnenden Zersetzung.

Während nun diese Substanzen, die sich sämtlich auf einen ein aromatisches Hydroxyl tragenden Grundkörper zurückführen lassen, mehr oder weniger leicht unter der Einwirkung der Sulfatase ihre Schwefelsäure abgeben, liegen, wie schon im allgemeinen Teil hervorgehoben wurde, die Verhältnisse bei den Körpern der aliphatischen und hydroaromatischen Reihe wesentlich anders.

Unter denselben Versuchsbedingungen sind die Alkalisalze der *Äthyl- und Amyl-schwefelsäure* durch Sulfatase nicht angreifbar. Ebenso verhielten sich die Kaliumsalze der *d- und l-Borneol-schwefelsäuren* und das der *m-Methylcyclohexanol-schwefelsäure*; letzteres konnte in Analogie zu den Borneolsalzen durch Veresterung mit Chlorsulfonsäure dargestellt werden und bildete schöne große, perlmutterartig glänzende Blättchen.

Ebenso wie die borneol-ätherschwefelsauren Salze gegen Sulfatase resistent waren, zeigten sie auch eine bemerkenswerte Widerstandsfähigkeit gegen die Hydrolyse mit Säuren, ganz im Gegensatz zu den aromatischen Äthersulfaten, die zum größten Teil sehr leicht durch Mineralsäuren zerlegt werden. Eine wirklich quantitative hydrolytische Zersetzung war nur mit dem von *C. Neuberg* und *J. A. Mandel*[1]) angegebenen Verfahren möglich.

Wie schon erwähnt, führten die Versuche auch beim *Äthersulfat der Mandelsäure* zu einem negativen Resultat hinsichtlich des Verhaltens zur Sulfatase. Dieses Salz konnte relativ leicht nach der Methode von *Czapek* gewonnen werden. Es ist in Wasser beträchtlich, in Alkohol und Äther sehr schwer löslich und kristallisiert in weißen, nadelförmigen, meist fächer- oder sternförmig aneinander liegenden Kristallen.

Die *Untersuchungen über den Mechanismus der Sulfatasewirkung* wurden fast ausnahmslos mit dem leicht in größeren Mengen zu beschaffenden phenol-schwefelsauren Kalium angestellt.

Die Tabelle VI soll zunächst die fast gleichen Effekte von Calciumcarbonat und Bariumcarbonat in ihrer Eigenschaft als schwefelsäurebindende Bodenkörper sowie die günstige Beeinflussung der Reaktion durch Zugabe einer größeren Menge Toluol dartun.

Auf die erhöhte Spaltung bei Zusatz steigender Fermentmengen ist beim indoxylschwefelsauren Kalium schon hingewiesen worden.

Daß der Bodenkörper, z. B. Calciumcarbonat, tatsächlich alle durch die Enzymtätigkeit frei werdende Schwefelsäure neutralisieren

[1]) *C. Neuberg* und *J. A. Mandel*, diese Zeitschr. **71**, 206, 1915.

Tabelle VI.

1 proz. Lösung von ätherschwefelsaurem Salz ccm	Fermentmenge g	Verwendetes Erdalkalicarbonat	Toluolmenge Proz.	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
Phenolsalz 100	1,5	$CaCO_3$	1	0	0,0777	—
				1	0,0603	22,39
				3	—	—
				6	0,0520	31,52
				12	0,0507	34,75
Phenolsalz 100	1,5	$BaCO_3$	1	0	0,0777	—
				1	0,0587	24,45
				3	0,0541	30,37
				6	0,0524	32,56
				12	0,0485	37,58
Phenolsalz 100	1,5	$CaCO_3$	75	0	0,0777	—
				1	0,0554	28,70
				3	0,0464	40,28
				6	0,0438	43,63
				12	0,0423	45,56

kann, wurde dadurch gezeigt, daß zu einer Lösung von phenolschwefelsaurem Kalium mit $CaCO_3$ als Bodenkörper ohne Fermentzusatz die Menge Schwefelsäure hinzugegeben wurde, welche theoretisch aus der in Lösung befindlichen Menge von ätherschwefelsaurem Salz frei werden kann. Die Schwefelsäure wurde in Zwischenräumen in Form von n H_2SO_4 der Lösung hinzugefügt. Es ergab sich hierbei, daß das $CaCO_3$ alle Schwefelsäure aufnimmt, da selbst nach Wochen eine Spaltung des Äthersulfates durch die fraktioniert hinzugegebene Mineralsäure nicht nachgewiesen werden konnte.

Auch sei bemerkt, daß aus dem Fermentmaterial selbst keine Säure frei wird, da eine wässerige, mit 1 Proz. Toluol konservierte Takadiastaselösung nach einer Woche ihren p_H-Wert (6,8) nicht geändert hatte.

Erwähnt wurde schon, daß der Zusatz von sauren und basischen Puffergemischen keinen günstigen Einfluß auf die Reaktion ausübt, wie das schon *C. Neuberg* und *K. Linhardt* (l. c.) angegeben haben.

Daß es sich bei den beschriebenen Vorgängen um ausgesprochen enzymatische Betätigungen handelt, wurde dadurch bewiesen, daß ein ätherschwefelsaures Salz, in diesem Falle indoxyl-schwefelsaures Kalium, mit einer Sulfataselösung zusammengebracht wurde, die zuvor 2 Stunden im Wasserbade erhitzt gewesen war. Selbst nach 14 Tagen war nicht die geringste Zersetzung eingetreten.

Weiter konnte belegt werden, daß die Sulfatase zu den in Wasser leicht löslichen Fermenten gehört; denn wie die folgende Tabelle VII lehrt, äußert eine klar filtrierte Lösung des Enzyms dieselben spaltenden Fähigkeiten wie das feste Fermentmaterial.

Tabelle VII.

Phenolsalz g	1 proz. Lösung des Ferments ccm	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Äthersulfat g	Spaltung Proz.
1,0	100	0	0,0790	—
	(klar filtriert)	2	0,0545	31,01
		5	0,0534	32,41
1,0	100	0	0,0759	—
	(nicht filtriert)	2	0,0526	30,70
		5	0,0491	35,31

Bemerkungen zu den Mitteilungen von E. Mislowitzer „Ein neues Potentiometer“ und „Eine neue Doppelelektrode in Becherglasform“[1]).

Von

Max Trénel.

(Aus der Preußischen Geologischen Landesanstalt Berlin.)

(Eingegangen am 25. Juni 1925.)

In der erstgenannten Mitteilung erhebt Herr Dr. *Mislowitzer* den Anspruch, eine neues Potentiometer angegeben zu haben, „dessen Bedienung leicht und dessen Störungsmöglichkeit klein ist“. Demgegenüber muß ich darauf hinweisen, daß ich ein solches Gerät bereits in einer Mitteilung vom 31. Dezember 1923 beschrieben habe[2]). In meinem Potentiometer ist ein gegen Stromentnahme und Transport empfindliches Normalelement vermieden und durch eine Hilfsbatterie ersetzt, deren Spannung jederzeit durch ein Meßinstrument überwacht wird. Durch diese Einrichtung ist es möglich, den Temperaturfaktor experimentell auszuschalten und die p_H direkt abzulesen. Daß Herr *Mislowitzer* nur amerikanische Vorbilder kennen will, ist um so merkwürdiger, als er mein „Acidimeter“ in der Sitzung der Pharm. Gesellschaft vom 10. Dezember 1924 kennengelernt und zur Diskussion gesprochen hat.

Bezüglich der „Doppelelektrode“ führt Herr *Mislowitzer* meine Arbeiten zwar beiläufig an, verschweigt aber den Kern der Sache, daß nämlich eine Elektrodenanordnung, in der beide Lösungen — in einem Becherglas vereint — durch ein Diaphragma direkt in Berührung stehen, von mir ebenfalls bereits beschrieben worden ist (siehe auch mein D. R.-P. 399410 vom 7. Dezember 1923).

In einer weiteren Arbeit „Über eine einfache Vorrichtung für elektrochemische Potentialmessungen“ habe ich ausdrücklich gesagt: „Es wird eine einfache Vorrichtung zur potentiometrischen Bestimmung der aktuellen Acidität *unter Vermeidung elektrolytischer Stromschlüssel* angegeben“. Obwohl Herr *Mislowitzer* diese Arbeit zitiert, behauptet er dennoch, als erster die Vereinigung von beiden Elektroden in einem Gefäß unter Fortfall von Hebern angegeben zu haben.

---

[1]) Diese Zeitschr. **159**, 68, 1925.

[2]) Internat. Mitt. f. Bodenkunde **14**, Heft 1; Zeitschr. f. Elektrochem. **30**, 544, 1924.

Der mit KCl getränkte Glasschliff des Herrn Dr. *Mislowitzer* ist nichts anderes als ein Diaphragma und nur eine Ausführungsform des von mir ausgesprochenen Gedankens, daß bei Verwendung von Chinhydron beide Lösungen sich direkt berühren dürfen, ohne daß große Fehler auftreten. Die Tatsache selbst, daß die Flüssigkeitshaut ungefetteter Glasschliffe eine elektrolytische Verbindung darstellt, ist in der physikalischen Chemie allgemein bekannt[1]).

Auf Grund dieser Tatsachen erhebe ich den Anspruch auf die Priorität der von Herrn *Mislowitzer* beschriebenen angeblichen Neuerungen. Falls Herr *Mislowitzer* den Nachweis der Duplizität führen kann, so möchte ich doch auf die Art hinweisen, wie er meine Arbeiten, die ihm wohlbekannt sind, zitiert, bzw. im Falle „Potentiometer" nicht zitiert.

---

[1]) *Ostwald-Lutter*, Hand- u. Hilfsbuch für Ausführung phys.-chem. Messungen, S. 378, zweiter Absatz von oben. Leipzig 1902. — *Kohlrausch*, Lehrbuch der prakt. Physik, Leipzig 1910, S. 496, Zeile 20 von oben.

Entgegnung auf vorstehende Bemerkungen des Herrn Trénel.

Von

Ernst Mislowitzer.

(Eingegangen am 20. Juli 1925.)

Herr Dr. *Trénel* meldet sich mit Prioritätsansprüchen gegenüber meinen „angeblichen Neuerungen" und beschwert sich für den ihm unwahrscheinlichen Fall einer Duplizität über die „Art", wie ich ihn behandelt habe[1]).

Herr *Trénel* verlangt von mir den „Nachweis der Duplizität", so will ich also nachweisen, daß eine Duplizität vorliegt. Sie zeigt sich aber durchaus nicht zwischen Herrn *Trénel* und mir, sondern — zwischen Herrn *Trénel* und anderen.

Damit liefere ich gleichzeitig eine ausreichende Erklärung für die „Art", wie ich ihn zitiere, „bzw. im Falle des Potentiometers nicht zitiere".

I.

Der von Herrn *Trénel* im Jahre 1925 eingeleitete Prioritätsstreit über die Bau-Idee eines Potentiometers kommt etwas spät, da die Amerikaner schon 8 bis 10 Jahre lang über die verschiedenartigsten Potentiometer verfügen. Herr *Trénel* beginnt diesen Kampf nicht gegen die eigentlichen Erfinder des Potentiometers, sondern mit falscher Front gegen mich, der ich in meiner Arbeit ganz deutlich die allgemeinen Prioritätsrechte der Amerikaner anerkannt und mich auf die kurze Beschreibung eines „neuen", ein wenig vereinfachten Potentiometers beschränkt habe. Während aus meiner Arbeit ersichtlich ist, daß ich an dem allgemeinen Prinzip des Potentiometers keinen Anteil habe, geht Herr *Trénel*, der ebensowenig Anteil daran hat, in seinen Arbeiten mit Stillschweigen über die wissenschaftlichen Rechte der Amerikaner hinweg. Er kannte sie recht gut, wie aus der Diskussion zu seinem Vortrage im Dezember 1924 hervorging.

II.

Herr *Trénel* hat also keinen Anspruch darauf, in Verbindung mit dem *Prinzip* eines Potentiometers zitiert zu werden.

Da er aber eine *spezielle* Potentiometerkonstruktion angegeben hat, nämlich ein tragbares Potentiometer, so könnte er bei Beschreibung von

[1]) In Briefen an meine übergeordnete Dienststelle und auch an andere spricht er von der „in der Wissenschaft ungebräuchlichen und schwer verständlichen Art". Ich selbst habe keinen Brief erhalten.

tragbaren Potentiometern für den Fall auf Erwähnung rechnen, daß er der erste oder der beste Erbauer eines solchen Gerätes wäre. Ich habe kein tragbares Potentiometer beschrieben, sondern ein Instrument, das nur in einem Laboratorium zur Anwendung kommen kann und soll[1]). Somit entfällt für mich bereits jeder Grund für eine Nennung des Herrn *Trénel*. Selbst wenn ich aber ein transportables Potentiometer gebaut hätte, so wäre Herr *Trénel* von mir ebensowenig zitiert worden, denn Herr *Trénel* ist weder der erste Erbauer eines solchen Meßgerätes, noch hat sein Instrument gegenüber den älteren einen Vorzug. Nach meiner Ansicht ist eher das Entgegengesetzte der Fall.

Da Herr *Trénel* aber als Erfinder des tragbaren Potentiometers gelten will und in seiner ersten Arbeit behauptet, daß es nur auf Grund seiner Elektrodenanordnung möglich sei, ein transportables Meßgerät zu erhalten, muß ich mit folgendem das Gegenteil beweisen:

III.

Herr *Trénel* schreibt im Jahre 1924[2]):

„Damit fallen die eingangs geschilderten Schwierigkeiten fort, die die Anwendung der elektrischen Methode *im Felde bisher verhinderten*[3]), und *es ist nun möglich*[3]), die gesamte zur Messung notwendige Apparatur in einem Kasten so zu vereinigen, daß auch der Nichtphysiker an Hand einer einfachen Gebrauchsanweisung die elektrische Messung der Bodenacidität im freien Felde ausführen kann.“

Katalogmäßige Beschreibung eines amerikanischen Apparates aus dem Jahre 1921[4]):

„*Portable Hydrogen-Ion Potentiometer.*“

. . . „Standard cell, galvanometer, adjusting rheostat — all are enclosed in a substantial oak case 6 inches by 6 inches by 9½ inches, provided with a carrying strap. All parts are ruggedly constructed to withstand hard usage. This outfit will be found useful, not only in laboratory work, but *for field* and *plant survey* and elsewhere where convenient *portability* is a desirable feature.“

In der weiteren Beschreibung des amerikanischen Apparates steht über die Genauigkeit: „accuracy ± 0,5 Millivolt (1 % of a p_H unit).“ Vergleicht man diese Zahlen mit den Daten über die *Trénel*sche Nacherfindung[2]), so muß man dem älteren Apparat den Vorzug geben. Soviel über das Potentiometer.

IV.

In der Frage der Glasschliffelektrode kämpft Herr *Trénel* nicht nur um die Priorität, sondern auch um sein vermeintliches Eigentum. Das erklärt zur Genüge solche Aussprüche wie „ein Glasschliff ist nichts anderes als ein Diaphragma“. Diese Behauptung ist so abwegig, daß sie einer besonderen Widerlegung nicht bedarf. Der patentrichterliche Beschluß ist in demselben Sinne erfolgt.

[1]) Vgl. meine Arbeit.

[2]) Intern. Mitteilungen für Bodenkunde 1924, Heft 1.

[3]) Im Original nicht gesperrt.

[4]) *H. Thomas Company*, Philadelphia, Laboratory Apparatus and Reagents, Nr. 4832, 1921, S. 247.

Weiterhin bezeichnet Herr *Trénel* die elektrische Leitung durch einen Glasschliff als längst bekannt. Die geradlinige Fortführung einer derartigen Argumentation ist, daß er die elektrische Leitung durch einen Tonzylinder, wie sie in jedem Klingelelement stattfindet, bis zum Jahre 1924, also bis zur Anwendung durch Herrn *Trénel*, für unbekannt erklärt!

Zu allem Unglück sagt er von meiner Glasschliffelektrode sogar gleichzeitig, daß sie unter sein Patent falle, und daß ihr Prinzip seit langem bekannt sei. Der alleinige Schluß hieraus ist — daß er sein Patent zu Unrecht erhalten hat!

Da Herr *Trénel* aber mir den Nachweis der „Duplizität" zugeschoben hat, so muß ich ihn ebenfalls wieder führen. Und wieder besteht die Duplizität nicht zwischen Herrn *Trénel* und mir, sondern zwischen Herrn *Trénel* und den Amerikanern.

Sein „Erfindungsgedanke" aus dem Jahre 1924, die heberlose Tauchelektrode, findet sich in einem Katalog des Jahres 1921[1]) abgebildet. Auf diesem Bilde *aus dem Jahre 1921* steht ein *tragbares Potentiometer in Verbindung mit einer Tauchelektrode*, ganz ähnlich der Abbildung des Herrn *Trénel* in der Arbeit *aus dem Jahre 1924*[2])!

Im Gegensatz zu der Behauptung des Herrn *Trénel* stellt die Anwendung der Leitfähigkeit eines Glasschliffes auf ein Elektrodengefäß eine wesentliche Vereinfachung und Neuerung dar, die auf bequemste Weise einen hohen technischen Effekt ermöglicht.

---

[1]) *Leeds* und *Northrup*, Philadelphia, Potentiometerkatalog, Nr. 7694, 1921, S. 40; Calomel and Hydrogen Elektrode. Dip type.

[2]) Intern. Mitteilungen für Bodenkunde 1924, Heft 1.

Berichtigung.

L. Jendrassik und *H. Tangl*, Die Atropinhemmung und die Wirkung einiger organischer Säuren am Darm. Diese Zeitschr. **159**, 346, 1925, Abb. 7, unterste Zeile: statt „Na-Acetat unwirksam" ist „Na-Acetat *wirksam*" zu lesen.

Autorenverzeichnis.

